Instruction for Use

CgAnalyze Kit

Enzyme immunoassay for detection of chromogranin A

Microtitration 96 wells
Store the kit at +2-8 °C
For in vitro diagnostic use only

CE

Document No. E-23-0196-07DA
March, 2014

CgAnalyze Kit

English:	page 2
Français:	page 13
Español:	página..... 25
Deutsch:	Seite 37
Italiano:	pagina..... 49
Česky:	strana 61
Poski:	strona 74
Português:	página..... 87

REF K2378

IVD

Σ 96

CgAnalyze Kit

ENGLISH

INTENDED USE

The CgAnalyze Kit is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection and quantitation of chromogranin A in human plasma or serum. The results of the assay may be used as an aid in the diagnosis of chromogranin A secreting neuroendocrine tumours (NETs), such as phaeochromocytomas and carcinoids. The assay is intended for use in patients with signs and symptoms consistent for NETs. It is not intended for screening a healthy population.
The analysis should be performed by trained laboratory professionals.

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE.

SUMMARY AND EXPLANATION

Chromogranins and secretogranins constitute a family of uniquely acidic proteins that are co-stored with neurotransmitters and peptide hormones in the brain and the diffuse neuroendocrine system (Winkler, H. & Fischer-Colbrie, R.1992). Structurally these proteins are products of different genes but share some overall properties such as an abundance of acidic amino acid residues and several pairs of basic amino acids as potential positions for post-translational cleavage. Chromogranins are co-stored and co-released with neuropeptides and hormones in the neuroendocrine cells throughout the body. A role for chromogranins in the generation of hormonal granules and package of hormones has been suggested. Furthermore, chromogranins can be cleaved into smaller fragments, which can display biological activities such as inhibition of hormonal release, vasodilatation and anti-microbiological effects (Stridsberg M, 2000).

Tumours of neuroendocrine origin usually present with increased serum/plasma levels of chromogranin A (O'Connor, DT, Deftos LJ, 1986). The neuroendocrine tumours are derived from the neuroendocrine cells and typical neuroendocrine tumours are carcinoid tumours, pheochromocytomas, neuroblastomas, small cell lung cancers, hyperparathyroid adenomas, pituitary tumours and pancreatic islet tumours and including the MEN1 and MEN2 syndromes. This also includes the different neuroendocrine tumour syndromes, namely the gastrinomas, insulinomas, glucagonomas, somatostatinomas. PPomas and the non-functioning neuroendocrine tumours (Eriksson, B. et al. 2000). For these tumours, chromogranin A has been shown to be the best circulating marker (Bajetta, E. et al. 1999).

Principle of CgAnalyze Kit

In a separate dilution plate patient samples, calibrators and controls are diluted 5x in Diluent. The diluted material is transferred to the microtitre wells and incubated at room temperature for 60 minutes. During this first incubation a monoclonal antibody captures the chromogranin A to the surface of the well. After washing to remove unbound material a second, horseradish peroxidase (HRP) labelled monoclonal antibody is added to detect the chromogranin A bound to the well. After incubation for 30 minutes the wells are washed again and a colour substrate is added and incubated. The colour development is stopped after 15 minutes and the colour measured in a spectrophotometer. The colour is directly proportional to the amount of chromogranin A bound to the well. The amount of chromogranin is determined by comparison with the colour development of the calibrator samples.

The calibrator in the kit is a synthetic peptide corresponding to chromogranin A. The peptide calibrator is set to give a response equal to a purified, native fragment of chromogranin A (Stridsberg, M et al. 1993, Stridsberg et al. 1995)

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- For in vitro diagnostic use.
- The assay reagents contain no human serum components but the patient plasmas analysed should be handled as if capable of transmitting infectious agents.
- The Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health recommend that potentially infectious agents be handled at the Biosafety Level 2.
- Most of kit solutions contain ProClin 300 as a preservative. Never pipette by mouth or allow reagents or patient sample to come into contact with skin. Reagents containing ProClin 300 may be irritating. Avoid contact with skin and eyes. In case of contact, flush with plenty of water.
- The stop solution contains 0.5 M sulphuric acid. Do not allow the reagent to get into contact with the skin.
- The concentrations of chromogranin A in a given specimen determined with assays from different manufacturers can vary due to differences in assay methods and reagent specificity.
- All the waste should be handled as hazardous wastes.
- Material safety data sheets for all hazardous components contained in this kit are available on request from Dako Denmark A/S.

Warning

CAL	X	LYO
DIL		
CONJ	100X	

CONTROL	L	LYO
CONTROL	H	LYO

Contains ProClin 300:
Reaction mass of: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317:	May cause an allergic skin reaction.
P264:	Wash hands thoroughly after handling.
P280:	Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
P302+352:	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
P333+313:	If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

SPECIMEN COLLECTION

The CgAnalyze Kit is recommended for serum/EDTA/Heparin-plasma.
Handle as if capable of transmitting infectious agents.
The samples are separated by centrifugation and can be stored at 2-8 °C up to 7 days. If samples are to be kept for longer periods, store at -20 °C or colder. Samples may go through three freeze/thaw cycles without deterioration.
Do not use a frost-free freezer because it may allow the specimens to go through freeze-thaw cycles and degrade antibody. Samples that are improperly stored or are subjected to multiple freeze-thaw cycles may yield spurious results.

KIT COMPONENTS AND STORAGE OF REAGENTS

- One frame with 96 wells, sealed in a foil pack with a dry pack.
- Six vials with lyophilised calibrators containing human Chromogranin A in diluent. CAL 1 = 0 ng/mL (diluent), CAL 2 = 36 ng/mL, CAL 3 = 180 ng/mL, CAL 4 = 540 ng/mL, CAL 5 = 1080 ng/mL, CAL 6 = 1800 ng/mL.
- One vial with lyophilised Low control (L), green colour.
- One vial with lyophilised High control (H), red colour.
- 30 mL Diluent (DIL) containing biotin-labelled antibodies to Chromogranin A , red colour. Ready to use.
- 150 µL Conjugate (CONJ) containing HRP-labelled antibodies to Chromogranin A. 100x concentrated.

- 15 mL Conjugate buffer (blue colour). Ready to use.
- 15 mL Substrate TMB. Ready to use.
- 15 mL Stop solution (0.5M H_2SO_4). Ready to use.
- 2 x 35 mL Wash solution, 20x concentrated.

Before use
Lyophilised calibrators and controls should be carefully dissolved with 300 µL distilled water. After use the reconstituted calibrators and controls should be stored at -20 °C or lower. Calibrators and controls may go through three freeze/thaw cycles without deterioration. Other reagents in the kit should be stored at 2-8 °C.
Reconstituted calibrators and controls should be diluted 5x in diluent at each test occasion.
The amount of conjugate needed for each analysis should be diluted 100x before use (10uL conjugate + 990 uL conjugate buffer per strip). Remaining diluted conjugate shall be discarded.
Wash solution should be diluted 20x before use. Dilute 10 mL of the 20x concentrated wash solution in 190 mL distilled water. When stored at 2-8 °C, the diluted wash solution is stable until the date of expiration of the kit.
The rest of the reagents in the kit are ready for use.
Remove only the number of wells needed for testing, reseal the aluminium packaging carefully.

Materials or equipment required but not provided
- Microplate reader with 450 nm filter. Reference wavelength is 620 nm.
- 300 µL/well dilution plate for dilution of calibrator, patient samples and controls.
- Precision pipettes with disposable tips.
- Automatic microtitre plate washer, absorbent tissue, tubes and a timer.

PROCEDURE
All solutions should be used at room temperature. Incubate all steps at room temperature (20-30 °C).

Sample dilution and incubation
Dilute all samples 5x in a separate dilution plate before transferring to test plate. Calibrators, Low Control, High Control and patient plasma should all be diluted 50 µL plasma + 200 µL diluent. Mix thoroughly by pipetting up and down before transferring 100 µL in duplicate to the test plate according to the diagram below.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CAL 1	CAL 5	P1									
B	CAL 1	CAL 5	P1									
C	CAL 2	CAL 6	P2									
D	CAL 2	CAL 6	P2									
E	CAL 3	H	etc									
F	CAL 3	H										
G	CAL 4	L										
H	CAL 4	L										

Incubate for 60 minutes.

After sample incubation
Wash three (3) times with 300 µL washing solution/well, filling and emptying the wells each time. After the last wash, empty the wells by tapping the microtitre plate on an absorbent tissue.

Adding conjugate
Add 100 µL conjugate to each well.
Incubate for 30 minutes.

After conjugate incubation
Wash as before.

Adding substrate solution
Add 100 µL substrate TMB to each well, incubate in the dark for 15 minutes. The incubation time may be shortened to 10 minutes if maximum Optical Density (OD) exceeds 3.0 at high temperatures or if an automated method is applied.

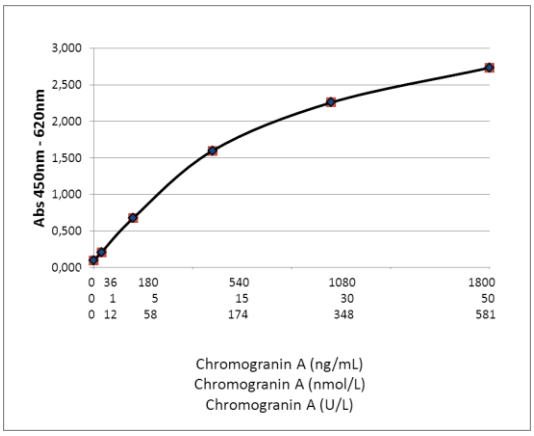
Adding stop solution
Add 100 µL stop solution to each well. Read the absorbance at 450 nm within 2h on a microplate reader. Read at 620 nm as a reference wavelength.

Calculations
Construct a calibrator curve by plotting the OD against the ng/mL values of the six calibrators. The six calibrators provided have values of 0 ng/mL for calibrator 1, 36 ng/mL for calibrator 2, 180 ng/mL for calibrator 3, 540 ng/mL for calibrator 4, 1080 ng/mL for calibrator 5, 1800 ng/mL for calibrator 6 respectively. Read the values of Low and High Controls and the patient samples from the curve.

Values greater than the highest calibrator value should be reported as >1800 ng/mL, or diluted further with assay diluent and re-assayed. In this case the compensation for the dilution must be made in the calculation of the chromogranin A concentration.
Please note: in the event of calibrator 1 or calibrator 6 values are out of range the test should be considered invalid and repeated.

For convenience concentrations can be calculated in ng/mL, nmol/L or U/L. Units are given in the table below. The molecular weight of the native fragment of chromogranin A (36kDa) was used for the conversion (Stridsberg, M et al. 1993, Stridsberg et al. 1995)

Calibrator	Concentration			Absorbance
	ng/mL	nmol/L	U/L	
1	0	0	0	0.094
2	36	1	12	0.209
3	180	5	58	0.678
4	540	15	174	1.599
5	1080	30	348	2.259
6	1800	50	581	2.735



A sample with an absorbance value of 1.272 will read on the X-axis as having 367 ng/mL (or 10.2 nmol/L or 118 U/L) of chromogranin A. In this example a four parameter logistic curve fit has been applied.
Important: The curve is an example and should not be used for actual patient sample interpretation.

Quality Control
The OD for calibrator 1 should be be < 0.15.
The OD for calibrator 6 should be > 1.0
The values of Low and High controls, see lot certificate.
The controls are intended to monitor for substantial reagent failure. If any of the control values are not within their respective ranges, the test should be considered invalid and should be repeated. Additional controls may be tested according to guidelines or requirements of local, state, and/or federal regulations or accrediting organisations. Refer to NCCLS C24-A for guidance on appropriate QC practices.

Hook effect
No hook-effect is observed when testing chromogranin A concentrations up to 360 000 ng/mL (or 10 000 nmol/L or 116 000 U/L).

LIMITATIONS
The individual patient's chromogranin A level cannot alone be used as a measure of disease severity. The test should not be relied upon as the sole basis of decisions on clinical therapy, but should be used in combination with clinical symptoms and the results of other available tests.

Interference
No interference was detected when plasma samples were spiked with bilirubin F (208 mg/L) , bilirubin C (200 mg/L), haemolytic haemoglobin (4.84 g/L) or chyle (1430 FTU).
Individuals receiving mouse anti-human antibodies for treatment or diagnosis, or those patients who have been otherwise exposed to mouse immunoglobulin, may produce human anti-mouse antibodies (HAMA). These antibodies can interfere with assays using mouse monoclonal antibodies and may cause falsely elevated levels.

Expected results
It is recommended that each laboratory establishes a reference range with samples commonly used since variations in sample handling may affect results. A strict sample handling routine as recommended above should be followed. The values given below are an indication of the expected reference range and calculated as the 97.5 percentile of 126 blood donor heparin plasma samples (63 men and 63 women).

Reference range Heparin-plasma level of chromogranin A: $\leq$ 108 ng/mL (or 3.0 nmol/L or 35 U/L).

Limit of Detection
The limit of detection of this assay is 19 ng/mL (or 0.54 nmol/L or 6 U/L). This is the lowest detectable concentration that differs from zero with a probability of 95%. It means that reliable measurements can be done even on negative samples down to this point. The calculation was done according to NCCLS guideline EP17-A vol. 24 no. 34.

Non-tumour associated increases of chromogranin A
Increased levels of chromogranin A can be found in patients with decreased renal function, patients with atrophic gastritis and patients with ongoing treatments with proton-pump inhibitory drugs.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Table 1. Clinical sensitivity and specificity.

Clinical sensitivity
A total of 107 Heparin-plasma samples with clinical characterisation were assayed. The following table summarises the results

Disease groups	Total number	Positive >3.0 nmol/L	Negative ≤ 3.0 nmol/L	Sensitivity %
ECL	4	3	1	75
EPT	30	19	11	63
FGC	10	7	3	70
LC	9	4	5	44
MGC	47	28	19	60
NE Diff	6	2	4	33
Paragangliom	1	1	0	100

ECL = Enterochromaffin-like Tumours
EPT = Endocrine pancreas Tumour
FGC = Foregut carcinoid
LC = Lung carcinoid
MGC = Midgut carcinoid
NE Diff = Neurocrine differentiation

Specificity
126 Heparin-plasma samples from apparently healthy blood donors were assayed, 126 samples were negative:

126/126 = 100% 95% CI = 97.1%-100%

The 95% confidence interval (CI) was calculated using the exact method.

Table 2. Inter-assay precision was determined by testing six different samples in eight replicates at three separate occasions.

	1	2	3	4	5	6
Mean value (ng/mL)	150	209	316	486	838	1212
SD	14.0	10.8	28.3	41.7	80.6	69.8
% CV	9	5	9	9	10	6

Table 3. Intra-assay precision was determined by testing six different samples in eight replicates at one occasion.

	1	2	3	4	5	6
Mean value (ng/mL)	156	214	335	502	868	1255
SD	6.4	11.3	10.4	23.3	42.8	101.4
% CV	4	5	3	5	5	8

Table 4. Batch to batch variation was determined by testing six different samples in eight replicates on three different batches.

	1	2	3	4	5	6
Mean value (ng/mL)	145	205	309	459	794	1165
SD	9.6	7.8	22.9	38.5	69.2	78.1
% CV	7	4	7	8	9	7

Table 5. Dilution recovery was determined by testing five serial dilutions for three different samples.

Sample	**Dilution**	**Mean Measured Concentration (ng/mL)**	**Calculated Concentration (ng/mL)**	**Dilution Corrected % Recovery**
1	1/5	1540	1540	100
	1/10	756	770	98
	1/20	366	385	95
	1/40	179	193	93
	1/80	90	96	94
Sample	**Dilution**	**Mean Measured Concentration (ng/mL)**	**Calculated Concentration (ng/mL)**	**Dilution Corrected % Recovery**
2	1/5	1134	1134	100
	1/10	587	567	104
	1/20	278	283	98
	1/40	139	142	98
	1/80	72	71	101
Sample	**Dilution**	**Mean Measured Concentration (ng/mL)**	**Calculated Concentration (ng/mL)**	**Dilution Corrected % Recovery**
3	1/5	1293	1293	100
	1/10	625	646	97
	1/20	292	323	90
	1/40	144	162	89
	1/80	76	81	94

TROUBLESHOOTING

Problem	Possible causes	Corrective action
One or more calibrators out of range.	1. One or more reagents not added, or added in wrong sequence.	1. Test invalid. Repeat test.
	2. Improper pipetting.	2. Test invalid. Repeat test.
Control values out of range.	1. Incorrect temperature, timing or pipetting; reagents not mixed.	1. Check that the time and temperature was correct. See ”Poor precision” below. Repeat test.
	2. Cross contamination of controls.	2. Pipette carefully.
	3. Improper dilution.	3. Repeat test.
	4. Optical pathway not clean.	4. Check for dirt or air bubbles in the wells. Wipe bottom of the plate and reread.
All test results blank.	1. One or more reagents not added, or added in wrong sequence.	1. Recheck procedure. Check for unused reagent. Repeat test.
	2. Coated plate inactive.	2. Check for obvious moisture in unused wells. Wipe bottom of the plate and reread.
All test results yellow.	1. Contaminated buffers or reagents.	1. Check all solutions for turbidity or foul smell.
	2. Wash solution contaminated.	2. Use clean container. Check quality of water solution used to prepare.
	3. Improper dilution of serum.	3. Repeat test.
Maximum OD is elevated (exceeds 3.0)	1. Too high incubation temperatures/use of automated method.	1. Reduce the incubation time for substrate.
Poor precision.	1. Pipette delivery CV higher than 5%.	1. Check calibration of pipette. Use reproducible technique.
	2. Sample or reagents not mixed sufficiently or not equilibrated to room temperature.	2. Mix all reagents gently but thoroughly and equilibrate to room temperature.
	3. Reagent addition taking too long; inconsistency in timing intervals.	3. Develop consistent uniform technique and use multi-tip device or auto dispenser to decrease time.
	4. Optical pathway not clean.	4. Check for air bubbles in the wells. Wipe bottom of the plate and reread.
	5. Washing not consistent; trapped bubbles; wash solution left in the wells.	5. Check that all wells are filled and aspirated uniformly. Dispense liquid above level of reagent in well. After the last wash, empty the wells by tapping the plate on an absorbent tissue.
	6. Improper pipetting.	6. Avoid air bubbles in pipette tips.

REFERENCES

1. Bajetta, E., Ferrari, L., Martinetti, A., Celio, L., Procopio, G., Artale, S., Zilembo, N., Di Bartolomeo, M., Seregni, E. and Bombardieri, E.
Chromogranin A, neuron specific enolase, carcinoembryonic antigen, and hydroxyindole acetic acid evaluation in patient with neuroendocrine tumours.
*Cancer 1999, **86:**858-865.*

2. Eriksson, B., Öberg, K. and Stridsberg, M.
Tumour markers in neuroendocrine tumours.
*Digestion 2000, **62:**33-38.*

3. O'Connor, D.T. and Deftos, L.J.
Secretion of chromogranin A by peptide-producing endocrine neoplasms.
*New England Journal of Medicine 1986, **314:**1145-1151.*

4. Stridsberg, M., Hellman, U., Wilander, E., Lundqvist, G., Hellsing, K. and Öberg, K.
Fragments of chromogranin A are present in the urine of patients with carcinoid tumours: Development of a specific radioimmunoassay for chromogranin A and its fragments.
Journal of Endocrinology 1993, **139:**329-337.

5. Stridsberg, M., Öberg, K., Li, Q., Engström, U. and Lundqvist, G.
Measurements of chromogranin A, chromogranin B (secretogranin I), chromogranin C (secretogranin II) and pancreastatin in plasma and urine from patients with carcinoid tumours and endocrine pancreatic tumours.
*Journal of Endocrinology 1995, **144:**49-59.*

6. Stridsberg, M.
Measurements of chromogranins and chromogranin-related peptides by immunological methods.
*Advanced Experimental and Medical Biology 2000, **482:**319-327.*

7. Winkler, H. and Fischer-Colbrie, R.
The chromogranin A and B: The first 25 years and future perspectives.
*Neuroscience 1992, **49:**497-528.*

EXPLANATION OF SYMBOLS

Ag	Antigen (coated plate).
DIL	Diluent.
BUF **CONJ**	Conjugate buffer.
CONJ **100X**	Conjugate HRP 100x conc.
BUF **WASH** **20X**	Wash buffer 20x concentrate.
SUBS **TMB**	Solution TMB (substrate solution).
H_2SO_4 **0.5M**	Sulphuric Acid, 0.5 molar (stop solution).
CAL **X** **LYO**	Lyophilised calibrator.
CONTROL **L** **LYO**	Lyophilised Low control.
CONTROL **H** **LYO**	Lyophilised High control.

	Batch code.
	Catalogue number.
	Use-by date.
	Temperature limitation.
	Biological risk.
	Consult instructions for use.
	In vitro diagnostic medical device.
	Manufacturer.
	Warning.
	Contains sufficient for 96 tests.
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive.

CgAnalyze Kit

FRANÇAIS

INDICATIONS

Le Kit CgAnalyze est un dosage avec immunoadsorbant lié à une enzyme (ELISA) conçu pour la détection et la quantification de la chromogranine A dans le plasma ou le sérum humain. Les résultats du dosage peuvent être utilisés pour aider au diagnostic des tumeurs neuroendocrines (TNE) sécrétant de la chromogranine A telles que les phéochromocytomes et les carcinoïdes. Le dosage est indiqué chez les patients présentant des signes et symptômes correspondant aux TNE. Il n'est pas indiqué pour le dépistage des populations saines.
La réalisation de cette analyse est exclusivement réservée aux professionnels de laboratoire qualifiés.

À UTILISER EN DIAGNOSTIC IN VITRO.

RESUME ET EXPLICATION

Les chromogranines et les sécrétogranines constituent une famille de protéines particulièrement acides qui sont co-stockées avec les neurotransmetteurs et les hormones peptidiques dans le cerveau et le système neuroendocrinien diffus (Winkler, H. & Fischer-Colbrie, R.1992). D'un point de vue structurel, ces protéines sont les produits de différents gènes, mais elles disposent de certaines propriétés globales communes telles qu'une abondance de résidus d'acides aminés et plusieurs paires d'acides aminés de base servant de positions potentielles pour le clivage post-translationnel. Les chromogranines sont co-stockées et co-libérées avec les neuropeptides et les hormones des cellules endocrines dans l'ensemble de l'organisme. L'un des rôles des chromogranines peut résider dans la production de granules hormonaux et il a été question d'empaquetage d'hormones. Qui plus est, les chromogranines peuvent être clivées en fragments de taille inférieure susceptibles de présenter des activités biologiques telle que l'inhibition de la libération hormonale, la vasodilatation et des effets anti-microbiologiques (Stridsberg M, 2000).

Les tumeurs d'origine endocrinienne s'accompagnent généralement de niveaux de chromogranine A élevés dans le sérum et le plasma.(O'Connor, DT, Deftos LJ, 1986). Les tumeurs neuroendocrines sont dérivées des cellules neuroendocrines et les tumeurs neuroendocrines typiques sont les carcinoïdes, les phéochromocytomes, les neuroblastomes, les cancers bronchiques à petites cellules, les adénomes parathyroïdiens, les tumeurs hypophysaires, et les tumeurs des îlots de Langherans, y compris les syndromes MEN1 et MEN2. Elles comptent également les différents syndromes des tumeurs neuroendocrines, notamment les gastrinomes, insulinomes, glucagonomes, somatostatinomes. PPomes et tumeurs pancréatiques neuroendocrines non fonctionnelles (Eriksson, B. et al.2000). 2000). Pours ces tumeurs, la chromogranine A s'est avérée être le meilleur marqueur circulant (Bajetta, E. et al. 1999).

Principe du dosage CgAnalyze Kit

Les échantillons patient, calibrateurs et témoins sont dilués 5 fois dans du diluant dans des plaques de dilution séparées. La matériel dilué est transféré sur les puits de microtitrage et incubé à température ambiante pendant 60 minutes. Au cours de cette première incubation, un anticorps monoclonal capture la chromogranine A à la surface du puits. Suite à un lavage destiné à supprimer la matière non liée, on ajoute un second anticorps monoclonal marqué à la peroxydase de raifort (HRP) pour détecter la chromogranine A liée au puits. Après une incubation de 30 minutes, les puits sont à nouveau lavés et un substrat coloré est ajouté et incubé. La coloration est interrompue au bout de 15 minutes et on mesure la couleur dans un spectrophotomètre. La couleur est directement proportionnelle à la quantité de chromogranine A liée au puits. La quantité de chromogranine est déterminée au moyen d'une comparaison avec la coloration des échantillons de calibrage.

Le calibrateur du kit est un peptide synthétique correspondant à la chromogranine A. Le calibrateur peptide est conçu pour donner une réponse égale à celle d'un fragment natif purifié de chromogranine A (Stridsberg, M et al. 1993, Stridsberg et al. 1995)

Mises en garde et précautions d'emploi
- À utiliser en diagnostic in vitro.
- Les réactifs du dosage ne contiennent pas d'éléments de sérum humain mais lors de la manipulation des plasmas de patient analysés, il sera nécessaire de considérer ces derniers comme potentiellement susceptibles de transmettre des agents infectieux.
- Les centres de contrôle et prévention des pathologies et les instituts nationaux concernés par les affaires de santé conseillent de manipuler les agents potentiellement infectieux selon le niveau 2 de biosécurité.
- La plupart des solutions du kit contiennent l'agent de conservation ProClin 300. Ne jamais pipeter à la bouche ou laisser des réactifs ou échantillons de patients entrer en contact avec la peau. Les réactifs contenant de la ProClin 300 sont potentiellement irritants. Eviter tout contact avec la peau et les yeux. En cas de contact, rincer abondamment à l'eau.
- La solution d'arrêt contient de l'acide sulfurique 0,5 M. Ne pas laisser le réactif entrer en contact avec la peau.
- Les concentrations de chromogranine A d'un spécimen donné déterminées par dosages en provenance de fabricants différents peuvent varier en raison des différences entre les méthodes de dosage et la spécificité des réactifs.
- Manipuler et gérer tous les déchets en tant que déchets dangereux.
- On peut se procurer les fiches de données de sécurité relatives à tous les constituants dangereux inclus dans le coffret sur demande auprès de Dako Denmark A/S.

Attention

CAL	X	LYO
DIL		
CONJ	100X	

CONTROL	L	LYO
CONTROL	H	LYO

Contient ProClin 300:
Masse de réaction de: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317:	Peut provoquer une allergie cutanée.
P264:	Se laver soigneusement les mains après manipulation.
P280:	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P302+352:	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: laver abondamment à l'eau et au savon.
P333+313:	En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: consulter un médecin.

PRELEVEMENT DE SPECIMENS
Il est recommandé d'utiliser le dosage CgAnalyze Kit sur du plasma hépariné/EDTA/sérum. Le manipuler comme potentiellement susceptible de transmettre des agents infectieux. Les échantillons sont séparés par centrifugation et peuvent être conservés à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant un maximum de 7 jours. Si les spécimens doivent être gardés plus longtemps, les entreposer à des températures de -20° ou inférieures. Les échantillons pourront être soumis à 3 cycles de congélation/décongélation sans détérioration.

Ne pas utiliser de congélateur sans givre étant donné que ce genre de congélateur est susceptible d'exposer les spécimens à des cycles de congélation et décongélation consécutives et de dégrader l'anticorps. Les échantillons incorrectement entreposés ou ayant été exposés à plusieurs cycles de congélation et décongélation consécutives sont susceptibles de produire des résultats erronés.

ELEMENTS DU KIT ET ENTREPOSAGE DES REACTIFS

- Un cadre avec 96 puits, hermétiquement emballé dans une pochette métallisée avec sachet anti-humidité.
- Six flacons de calibrateurs lyophilisés contenant de la chromogranine A humaine dans du diluant. CAL 1 = 0 ng/ml (diluent), CAL 2 = 36 ng/ml, CAL 3 = 180 ng/ml, CAL 4 = 540 ng/ml, CAL 5 = 1080 ng/ml, CAL 6 = 1800 ng/ml.
- Un flacon de témoin bas lyophilisé (marqué « L » pour « low », de couleur verte) .
- Un flacon de témoin haut lyophilisé (marqué « H » pour « high », de couleur rouge) .
- 30 ml de diluant (DIL) contenant des anticorps à la chromogranine A marqués à la biotine (de couleur rouge). Prêt à l'emploi.
- 150 µL de conjugué (CONJ) contenant des anticorps à la chromogranine A marqués à la HRP . Concentré 100 fois.
- 15 ml de tampon conjugué (de couleur bleue). Prêt à l'emploi.
- 15 ml de substrat de TMB. Prêt à l'emploi.
- 15 ml de solution d'arrêt (0,5 M H_2SO_4). Prêt à l'emploi.
- 2 x 35 ml de solution de lavage concentrée 20 fois.

Avant emploi

Les témoins et calibrateurs lyophilisés devront être délicatement dissous dans 300 µl d'eau distillée. Après l'emploi, les témoins et calibrateurs reconstitués devront être entreposés à une température de -20 °C ou inférieure. Les témoins et calibrateurs pourront être soumis à 3 cycles de congélation/décongélation sans détérioration.
Les autres réactifs du kit devront être entreposés à une température comprise entre 2 et 8 °C.
Les témoins et calibrateurs reconstitués devront être dilués 5 fois dans du diluant à l'occasion de chaque test.
La quantité de conjugué nécessaire à chaque analyse devra être diluée 100 fois avant l'emploi (10 ul de conjugué + 990 ul de conjugué tampon par bande). Jeter le reste de conjugué dilué. La solution de lavage devra être diluée 20 fois avant emploi. Diluer 10 ml de la solution de lavage concentrée 20x dans 190 ml d'eau distillée. Lorsqu'elle est entreposée à une température comprise entre 2 et 8°C, la solution de lavage diluée reste stable jusqu'à la date de péremption du kit.
Le reste des réactifs du kit sont prêts à l'emploi.
Enlever uniquement le nombre de puits nécessaires à l'analyse en prenant soin de refermer soigneusement l'emballage en aluminium.

Matériels ou équipements nécessaires non fournis

- Lecteur de microplaque avec filtre de 450 nm. Longueur d'onde de référence 620 nm.
- Plaque de microtitrage de 300 µl/puits pour la dilution du calibrateur, des échantillons patient et des témoins.
- Pipettes de précision à embouts jetables.
- Laveur automatique de plaques de microtitrage, papier absorbant, tubes et minuteur.

TECHNIQUE
Toutes les solutions doivent être utilisées à température ambiante. Incuber toutes les étapes à températures ambiante (20-30°).

Dilution et incubation des échantillons
Diluer 5 fois tous les échantillons dans une plaque de dilution séparée avant de les transférer sur la plaque d'analyse. Les calibrateurs, le témoin bas (L), le témoin haut (H) et le plasma de patient devront tous être dilués à raison de 50 µl plasma + 200 µl de diluant. Mélanger soigneusement en pipetant vers le haut et le bas avant de transférer 100µl, en duplicata, dans la plaque d'analyse et conformément au diagramme ci-dessous.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CAL1	CAL5	P1									
B	CAL1	CAL5	P1									
C	CAL2	CAL6	P2									
D	CAL2	CAL6	P2									
E	CAL3	H	etc									
F	CAL3	H										
G	CAL4	L										
H	CAL4	L										

Incuber pendant 60 minutes.

Après l'incubation de l'échantillon
Laver trois (3) fois avec 300 µl de solution de lavage/puits, en remplissant et en vidant les puits à chaque fois. Après le dernier lavage, vider les puits en tapotant la microplaque sur du papier absorbant.

Ajout du conjugué
Ajouter 100 µl de conjugué à chaque puits.
Incuber pendant 30 minutes.

Après incubation du conjugué
Laver selon les instructions ci-dessus.

Ajout de la solution de substrat
Ajouter 100 µl de substrat de TMB à chaque puits et incuber dans l'obscurité pendant 15 minutes. La durée d'incubation peut être ramenée à 10 minutes si la DO maximum est supérieure à 3,0 à haute temperature ou si on appliqué une methode automatisée.

Ajout de la solution d'arrêt
Ajouter 100 µl de solution d'arrêt à chaque puits. Lire l'absorbance à 450 nm sur un lecteur de microplaque dans les 2 heures. Lire à une longueur d'onde de référence de 620 nm.

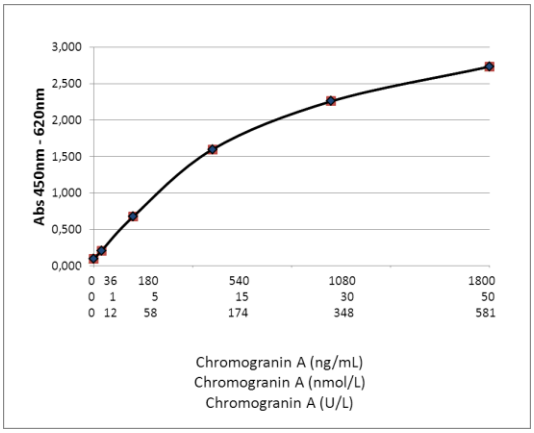
Calculs
Élaborer une courbe de calibrateur en reportant la DO par rapport aux valeurs ng/ml des six calibrateurs. Les six calibrateurs fournis ont respectivement des valeurs de 0 ng/ml pour le calibrateur 1, 1,36 ng/ml pour le calibrateur 2, 180 ng/ml pour le calibrateur 3, 540 ng/ml pour le calibrateur 4, 1080 ng/ml pour le calibrateur 5, 1800 ng/ml pour le calibrateur 6. Lire les valeurs du témoin bas et du témoin haut ainsi que les échantillons patient à partir de la courbe.

Les valeurs supérieures à la valeur de calibrateur la plus élevée devront être relevées comme étant >1800 ng/ml ou davantage diluées avec du diluant de dosage et réanalysées. Dans ce cas, il faudra compenser la dilution dans le cadre du calcul de la concentration de chromogranine A.

Par commodité, les concentrations peuvent être calculées en ng/ml, nmol/l ou U/L. Toutes les unités figurent dans le tableau ci-dessous. Le poids moléculaire du fragment natif de chromogranine A (36kDa) a été utilisé pour la conversion (Stridsberg M et al ; 1993, Stridsberg M et al, 1995)

Exemple

Calibrateur	Concentration			Absorbance
	ng/mL	nmol/L	U/L	
1	0	0	0	0.094
2	36	1	12	0.209
3	180	5	58	0.678
4	540	15	174	1.599
5	1080	30	348	2.259
6	1800	50	581	2.735



Un échantillon ayant une valeur d'absorbance de 1,272 apparaîtra sur l'abscisse comme ayant 367 ng/ml (ou 10,2 nmol/L, ou 118 U/L) de chromogranine A. Dans cet exemple, un ajustement de courbe logistique à 4 paramètres a été appliqué.
Important : Cette courbe est présentée à titre d'exemple et ne doit pas être utilisée pour l'interprétation des vrais échantillons de patients.

Contrôle qualité
La DO du calibrateur 1 doit être <0,15.
La DO du calibrateur 6 doit être >1,0.
Voit le certificat de lot pour ce qui concerne les valeurs du témoin haut et du témoin bas. Les témoins sont destinés à surveiller les risques de défaillance importante des réactifs. Si l'une quelconque des valeurs témoins ne se trouve pas dans sa plage respective, le test devra être considéré comme non valable et devra être recommencé. Des témoins supplémentaires pourront être testés conformément aux directives ou exigences règlementaires locales, fédérales ou nationales, ou émanant d'organismes d'accréditation. Consulter la norme NCCLS C24-A pour y consulter les directives relatives aux pratiques de contrôle qualité.

Effet de crochet
On n'a pas constaté d'effet de crochet lors de l'analyse des concentrations de chromogranine A jusqu'à 360 000 ng/ml (ou 10 000 nmol/l, 116 000 U/L).

LIMITATIONS
Le niveau de chromogranine A du patient individuel ne peut pas à lui seul être considéré représentatif de la gravité de la maladie. Il n'est pas prudent de se fier uniquement à ce test pour prendre des décisions thérapeutiques cliniques. Il devra plutôt être utilisé en parallèle avec les symptômes cliniques et les résultats d'autres analyses disponibles.

InterférenceIl n'a pas été détecté d'interférence lorsque des échantillons de plasma ont été caractérisés par de la bilirubine F (208 mg/l), de la bilirubine C (200 mg/l), de l'hémoglobine hémolytique (4,84 g/l) ou du chyle (1430 FTU). Les personnes recevant des anticorps anti-humain de souris à des fins de traitement ou de diagnostic, ou les patients ayant été autrement exposés à de l'immunoglobuline de souris sont susceptibles de produire des anticorps humains anti-souris (HAMA). Ces anticorps sont susceptibles d'interférer avec des dosages intégrant des anticorps monoclonaux de souris et de fausser les niveaux à la hausse.

Résultats prévus
Il est conseillé à chaque laboratoire d'établir sa propre plage de référence avec des échantillons communément utilisés étant donné que les variations de manipulation sont susceptibles d'influer sur les résultats. De strictes pratiques routinières de manipulation d'échantillons devront être observées conformément aux recommandations ci-dessus. Les valeurs indiquées ci-dessous donnent une indication de la plage de référence prévue et sont calculées pour correspondre au percentile 97,5 de 126 échantillons de donneurs de sang (63 hommes et 63 femmes).
Niveau de plage de référence de la chromogranine A : ≤ 108 ng/mL (ou 3,0 nmol/, ou 35 U/L).

Limite de détection
La limite de détection de ce dosage est de 0,19 ng/ml (ou 0,54 nmol/L, ou 6 U/L). Il s'agit de la concentration détectable la plus basse supérieure à zéro avec une probabilité de 95%. Cela signifie que des analyses peuvent être fiablement réalisées jusqu'à ce minimum, même sur des échantillons négatifs. Le calcul a été effectué conformément à la directive NCCLS EP17-A vol. 24 n°. 34.

Hausses de la chromogranine A non associées à une tumeur
Des hausses des niveaux de chromogranine A peuvent être notées chez des patients à la fonction rénale déficiente, les patients atteints de gastrite atrophique et les patients suivant un traitement continu de médicaments inhibiteurs de la pompe à protons.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Tableau 1. Spécificité et sensibilité clinique.

Sensibilité clinique
Un total de 107 échantillons de plasma hépariné avec caractérisation clinique ont été analysés. Le tableau ci-dessous récapitule les résultats obtenus.

Groupes pathologiques	Nombre total	Positif >3,0 nmol/l	Négatif ≤ 3,0 nmol/l	Sensibilité %
ECL	4	3	1	75
TEP	30	19	11	63
FGC	10	7	3	70
CP	9	4	5	44
MGC	47	28	19	60
Diff NE	6	2	4	33
Paraganglionnaire	1	1	0	100

ECL = Tumeurs à cellules entérochromaffine-like
TEP = Tumeur endocrine pancréatique
FGC = Carcinoïde de l'intestin antérieur
CP = Carcinoïde du poumon
MGC = Carcinoïde de l'intestin moyen
Diff NE = Différenciation neurocrine

Spécificité
Sur les 126 échantillons de plasma hépariné analysés provenant de donneurs apparemment sains, 126 étaient négatifs:

126/126 = 100% IC de 95% = 97,1-100%

L'intervalle de confiance (IC) de 95% a été calculé selon la méthode exacte.

Tableau 2. La précision inter-dosages a été déterminée en testant six échantillons différents en huit réplicats et en trois occasions distinctes.

	1	2	3	4	5	6
Valeur moyenne (ng/ml)	150	209	316	486	838	1212
S	14,0	10,8	28,3	41,7	80,6	69,8
% CV	9	5	9	9	10	6

Tableau 3. La précision intradosage a été déterminée en testant six échantillons différents en huit réplicats et en une occasion.

	1	2	3	4	5	6
Valeur moyenne (ng/ml)	156	214	335	502	868	1255
S	6,4	11,3	10,4	23,3	42,8	101,4
% CV	4	5	3	5	5	8

Tableau 4. La variation inter-lots a été déterminée en testant six échantillons différents en huit réplicats sur trois lots différents.

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Valeur moyenne (ng/ml)	145	205	309	459	794	1165
S	9,6	7,8	22,9	38,5	69,2	78,1
% CV	7	4	7	8	9	7

Tableau 5. La linéarité au test de dilution a été déterminée en testant cinq dilutions en série pour trois échantillons différents.

Échantillon	**Dilution**	**Concentration moyenne mesurée (ng/ml)**	**Concentration calculée (ng/ml)**	**Rendement corrigé par rapport à la dilution (%)**
1	1/5	1540	1540	100
	1/10	756	770	98
	1/20	366	385	95
	1/40	179	193	93
	1/80	90	96	94
Échantillon	**Dilution**	**Concentration moyenne mesurée (ng/ml)**	**Concentration calculée (ng/ml)**	**Rendement corrigé par rapport à la dilution (%)**
2	1/5	1134	1134	100
	1/10	587	567	104
	1/20	278	283	98
	1/40	139	142	98
	1/80	72	71	101
Échantillon	**Dilution**	**Concentration moyenne mesurée (ng/ml)**	**Concentration calculée (ng/ml)**	**Rendement corrigé par rapport à la dilution (%)**
3	1/5	1293	1293	100
	1/10	625	646	97
	1/20	292	323	90
	1/40	144	162	89
	1/80	76	81	94

RESOLUTION DES PROBLEMES COURANTS

Problème	Causes possibles	Action corrective
Un ou plusieurs calibrateurs hors plage.	1. Un ou plusieurs réactifs non ajoutés, ou ajoutés dans le mauvais ordre. 2. Pipetage incorrect.	1. Test non valable. Recommencer le test. 2. Test non valable. Recommencer le test.
Valeurs témoins hors plage.	1. Température, temporisation ou pipetage incorrects; Réactifs non mélangés. 2. Contamination croisée des témoins. 3. Dilution inappropriée. 4. Chemin optique sale.	1. Vérifier que la temporisation et la température étaient correctes. Voir ”Précision médiocre” ci-dessous. Recommencer le test. 2. Pipeter soigneusement. 3. Recommencer le test. 4. Vérifier s’il y a des saletés ou bulles d’air dans les puits. Essuyer la base et lire à nouveau.
Tous les résultats de test sont blancs.	1. Un ou plusieurs réactifs non ajoutés, ou ajoutés dans le mauvais ordre. 2. Plaque enduite inactive.	1. Revérifier la procédure. Vérifier en cas de réactif inutilisé. Recommencer le test. 2. Vérifier en cas d'humidité évidente dans les puits inutilisés. Essuyer la base de la plaque et lire à nouveau.
Tous les résultats de test sont jaunes.	1. Tampons ou réactifs contaminés. 2. Solution de lavage contaminée. 3. Dilution de sérum inappropriée.	1. Vérifier toutes les solutions en cas de turbidité ou d’odeur nauséabonde. 2. Utiliser un récipient propre. Vérifier la qualité de la solution aqueuse utilisée dans la préparation. 3. Recommencer le test.
Le seuil maximal de DO est dépassé (supérieur à 3.0)	1 Température d’incubation trop élevée / recours à une méthode automatisée	1. Réduire la durée d’incubation du substrat.
Précision médiocre.	1. CV de débit de pipette supérieur à 5%. 2. Échantillon ou réactifs non suffisamment mélangés ou non stabilisés à température ambiante. 3. Ajout du réactif durant trop longtemps; incohérence dans les intervalles de temporisation. 4. Chemin optique sale.	1. Vérifier l’étalonnage de la pipette. Utiliser la technique reproductible. 2. Mélanger tous les réactifs délicatement mais complètement et laisser stabiliser à température ambiante. 3. Développer une technique uniforme et cohérente et utiliser des dispositifs à plusieurs embouts ou pipeteurs automatiques pour raccourcir les délais. 4. Vérifier s’il y a des bulles d’air dans les puits. Essuyer la base de la plaque et lire à nouveau.

	5. Lavage incohérent, bulles Piégées; solution de lavage restant dans les puits.	5. Vérifier que tous les puits sont remplis et aspirés uniformément. Verser le liquide Pour qu'il arrive au dessus du niveau de réactif dans le puits. Après le dernier lavage, vider complètement les puits en tapotant la microplaque sur du papier absorbant.
	6. Pipetage incorrect.	6. Eviter les bulles d'air dans les embouts de pipettes.

REFERENCES

1. Bajetta, E., Ferrari, L., Martinetti, A., Celio, L., Procopio, G., Artale, S., Zilembo, N., Di Bartolomeo, M., Seregni, E. and Bombardieri, E.
Chromogranin A, neuron specific enolase, carcinoembryonic antigen, and hydroxyindole acetic acid evaluation in patient with neuroendocrine tumours.
Cancer 1999, **86:**858-865.

2. Eriksson, B., Öberg, K. and Stridsberg, M.
Tumour markers in neuroendocrine tumours.
Digestion 2000, **62:**33-38.

3. O'Connor, D.T. and Deftos, L.J.
Secretion of chromogranin A by peptide-producing endocrine neoplasms.
New England Journal of Medicine 1986, **314:**1145-1151.

4. Stridsberg, M., Hellman, U., Wilander, E., Lundqvist, G., Hellsing, K. and Öberg, K.
Fragments of chromogranin A are present in the urine of patients with carcinoid tumours: Development of a specific radioimmunoassay for chromogranin A and its fragments.
Journal of Endocrinology 1993, **139:**329-337.

5. Stridsberg, M., Öberg, K., Li, Q., Engström, U. and Lundqvist, G.
Measurements of chromogranin A, chromogranin B (secretogranin I), chromogranin C (secretogranin II) and pancreastatin in plasma and urine from patients with carcinoid tumours and endocrine pancreatic tumours.
Journal of Endocrinology 1995, **144:**49-59.

6. Stridsberg, M.
Measurements of chromogranins and chromogranin-related peptides by immunological methods.
Advanced Experimental and Medical Biology 2000, **482:**319-327.

7. Winkler, H. and Fischer-Colbrie, R.
The chromogranin A and B: The first 25 years and future perspectives.
Neuroscience 1992, **49:**497-528.

L’EXPLICATION DE SYMBOLES

Ag	Antigène (plaque revêtue).
DIL	Diluant.
BUF **CONJ**	Tampon conjugué.
CONJ **100X**	Conjugué de HRP concentré 100x.
BUF **WASH** **20X**	Tampon de lavage concentré (20x).
SUBS **TMB**	Solution de TMB (substrat).
H_2SO_4 **0.5M**	Acide sulfurique 0,5 M (solution d’arrêt).
CAL **X** **LYO**	Calibrateur lyophilisé.
CONTROL **L** **LYO**	Témoin bas lyophilisé.
CONTROL **H** **LYO**	Témoin haut lyophilisé.

	Numéro de lot.
	Numéro de catalogue.
	Date de péremption.
	Seuils de températures..
	Risque biologique.
	Lire le mode d'emploi.
	Dispositif médical de diagnostic in vitro.
	Fabricant.
	Attention.
	Contenu suffisant pour 96 tests.
	Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

CgAnalyze Kit

ESPAÑOL

USO PREVISTO

El Kit CgAnalyze es un ensayo inmunoabsorbente vinculado con enzimas (ELISA) para la detección y cuantificación de la cromogranina A en el plasma o suero humano. Los resultados del ensayo pueden usarse como ayuda para el diagnóstico de tumores neuroendocrinos (TNE) que segregan cromogranina A, como feocromocitomas y carcinoides. El ensayo está pensado para su uso en pacientes con indicios y síntomas que coincidan con TNE. No está pensado para realizar despistaje en una población sana.
El análisis deben realizarlo profesionales de laboratorio debidamente formados.

PARA USO EN DIAGNÓSTICO IN VITRO.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Las cromograninas y las secretograninas constituyen una familia de proteínas con una acidez exclusiva que se conservan conjuntamente con neurotransmisores y hormonas peptídicas en el cerebro y el sistema neuroendocrino difuso (Winkler, H. & Fischer-Colbrie, R.1992). Estructuralmente, estas proteínas son productos de diferentes genes pero comparten algunas propiedades globales como la abundancia de residuos aminoácidos ácidos y varios pares de aminoácidos básicos como posiciones posibles para la rotura postraduccional. Las cromograninas se conservan conjuntamente y se liberan conjuntamente con neuropéptidos y hormonas en las células neuroendocrinas en todo el cuerpo. Se ha sugerido un papel de las cromograninas en la generación de gránulos hormonales y en el empaquetamiento de hormonas. Además, las cromograninas se pueden romper en fragmentos más pequeños, que pueden mostrar actividades biológicas como inhibición de la liberación de hormonas, vasodilatación y efectos anti-microbiológicos (Stridsberg M, 2000).

Los tumores de origen neuroendocrino habitualmente presentan un aumento de los niveles séricos/plasmáticos de cromogranina A (O'Connor, DT, Deftos LJ, 1986). Los tumores neuroendocrinos proceden de las células neuroendocrinas y son tumores neuroendocrinos típicos los tumores carcinoides, los feocromocitomas, los neuroblastomas, los cánceres de pulmón de células pequeñas, los adenomas hiperparatiroideos, los tumores hipofisarios y los tumores de los islotes pancreáticos, incluyendo los síndromes MEN1 y MEN2. Esto incluye también los diferentes síndromes de tumores neuroendocrinos, como los gastrinomas, los insulinomas, los glucagonomas, los somatostatinomas, los PPomas y los tumores neuroendocrinos no funcionantes (Eriksson, B. et al. 2000). Para todos los tumores neuroendocrinos, se ha demostrado que la cromogranina A es el mejor marcador circulante (Bajetta, E. et al. 1999).

Principios de funcionamiento de CgAnalyze Kit

Se diluyen 5x en diluyente en una placa de dilución los calibradores, los controles y las muestras del paciente. El material diluido se transfiere a los pocillos de microtítulos y se incuban a temperatura ambiente durante 60 minutos. Durante esta primera incubación, un anticuerpo monoclonal captura la cromogranina A en la superficie del pocillo. Después del lavado para eliminar el material no unido, se añade un segundo anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa de rábano (HRP) para detectar la cromogranina A unida al pocillo. Después de 30 minutos de incubación, se lavan de nuevo los pocillos antes de añadir e incubar un sustrato de color. El desarrollo del color se detiene después de 15 minutos y el color se mide en un espectrofotómetro. El color es directamente proporcional a la cantidad de cromogranina A unida al pocillo. La cantidad de cromogranina se determina mediante una comparación con el desarrollo del color de las muestras de calibrador.

El calibrador del kit es un péptido sintético correspondiente a la cromogranina A. El calibrador del péptido se ajusta para tener una respuesta igual a un fragmento purificado y nativo de cromogranina A (Stridsberg, M et al. 1993, Stridsberg et al. 1995)

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Para uso diagnóstico in vitro.
- Los reactivos de ensayo no contienen componentes de suero humano pero el plasma de paciente analizado debe manejarse como si pudiera transmitir agentes infecciosos.
- Los centros para el control y la prevención de enfermedades y los institutos nacionales de salud recomiendan que los agentes potencialmente infecciosos se manipulen en un nivel 2 de bioseguridad.
- La mayoría de las soluciones del kit contienen ProClin 300 como conservante. Nunca pipetee con la boca ni permita que los reactivos o la muestra del paciente entren en contacto con la piel. Los reactivos que contienen ProClin 300 pueden ser irritantes. Evite el contacto con la piel y los ojos. En caso de contacto, enjuague con una cantidad abundante de agua.
- La solución de parada contiene ácido sulfúrico 0,5 M. Evitar el contacto del reactivo con la piel.
- Las concentraciones de cromogranina A en una muestra dada determinados con ensayos de diferentes fabricantes pueden variar debido a las diferencias en los métodos de ensayo y la especificidad de los reactivos.
- Todos los residuos deben manipularse como residuos peligrosos.
- Pueden solicitarse a Dako Dinamarca A / S las hojas de datos de seguridad del material para todos los componentes peligrosos contenidos en este kit.

CAL	X	LYO
DIL		
CONJ	100X	

CONTROL	L	LYO
CONTROL	H	LYO

Atención

Contiene ProClin 300:
Masa de reacción de: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317:	Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
P264:	Lávese bien las manos después de manipular.
P280:	Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
P302+352:	EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.
P333+313:	En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

RECOGIDA DE MUESTRAS

El CgAnalyze Kit se recomienda para plasma con suero/EDTA/heparina.
Manipule como si fuera capaz de transmitir agentes infecciosos.
Las muestras se separan mediante centrifugación y se pueden conservar a 2-8 °C durante hasta 7 días. Si las muestras se van a conservar durante períodos más largos, conservar a -20 °C o más frío. Las muestras pueden someterse a tres ciclos de congelación-descongelación sin deteriorarse.
No utilice un congelador sin escarcha, porque puede permitir a las muestras pasar por ciclos de congelación-descongelación y degradar el anticuerpo. Las muestras que se conserven inadecuadamente o se sometan a múltiples ciclos de congelación-descongelación pueden dar resultados falsos.

COMPONENTES DEL KIT Y CONSERVACIÓN DE LOS REACTIVOS

- Un marco con 96 pocillos, sellado en un paquete de lámina de aluminio con un paquete seco.
- Seis viales con calibradores liofilizados que contienen cromogranina A humana en diluyente. CAL 1 = 0 ng/mL (diluyente), CAL 2 = 36 ng/mL, CAL 3 = 180 ng/mL, CAL 4 = 540 ng/mL, CAL 5 = 1080 ng/mL, CAL 6 = 1800 ng/mL.
- Un vial con control bajo (L) liofilizado, color verde.
- Un vial con control alto (H) liofilizado, color rojo.
- 30 ml de diluyente (DIL) que contiene anticuerpos marcados con biotina de la cromogranina A. (color rojo). Listo para usar.
- 150 µl de conjugado (CONJ) que contiene anticuerpos marcados con HRP de la cromogranina A. Concentración 100x.
- 15 ml de tampón de conjugado (color azul). Listo para usar.
- 15 ml de sustrato TMB. Listo para usar.
- 15 ml de solución de parada (0,5 M H_2SO_4). Listo para usar.
- 2 x 35 ml de solución de lavado, concentrada 20x.

Antes de su uso

Los controles y calibradores liofilizados deben disolverse cuidadosamente con 300 µl de agua destilada. Después de su uso, los controles y calibradores reconstituidos deben conservarse a -20 °C o menos. Los calibradores y controles pueden someterse a tres ciclos de congelación-descongelación sin deteriorarse.
Los demás reactivos en el kit deben conservarse a 2-8 °C.
Los calibradores y controles reconstituidos deben diluirse en diluyente 5x para cada prueba.
La cantidad de conjugado necesaria para cada análisis debe diluirse 100x antes de usar (10 uL de conjugado + 990 uL de tampón de conjugado por tira). Debe desecharse el conjugado diluido sobrante.
La solución de lavado debe diluirse 20x antes de su uso. Diluya 10 ml de la solución de lavado concentrada 20x en 190 ml de agua destilada. Cuando se conserva a 2-8 °C, la solución de lavado diluida es estable hasta la fecha de caducidad del kit.
El resto de los reactivos del kit están listos para usarlos.
Extraiga sólo el número de pocillos necesarias para las pruebas, volviendo a cerrar el paquete de aluminio cuidadosamente.

Materiales o equipo necesarios pero no suministrados

- Lector de microplacas con filtro de 450 nm. Longitud de onda de referencia 620 nm.
- Placa de dilución de 300 µl/pocillo para la dilución del calibrador, muestras del paciente y controles.
- Pipetas de precisión con puntas desechables.
- Lavador automático de placas de microtítulos, tejido absorbente, tubos y un temporizador.

PROCEDIMIENTO

Todas las soluciones deben usarse a temperatura ambiente. Incube todos los pasos a temperatura ambiente (20-30 °C).

Dilución e incubación de la muestra
Diluya todas las muestras 5x en una placa de dilución separada antes de transferirlas a la placa de muestras. Los calibradores, el control bajo, el control alto y el plasma del paciente deben diluirse en 50 µL de plasma + 200 µL de diluyente. Mezclar bien pipeteando arriba y abajo antes de transferir 100 µl por duplicado a la placa de prueba de acuerdo con el siguiente diagrama.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CAL1	CAL5	P1									
B	CAL1	CAL5	P1									
C	CAL2	CAL6	P2									
D	CAL2	CAL6	P2									
E	CAL3	H	etc									
F	CAL3	H										
G	CAL4	L										
H	CAL4	L										

Incubar durante 60 minutos.

Después de la incubación de la muestra
Lavar tres (3) veces con 300 µl de solución de lavado/pocillo, llenando y vaciando los pocillos cada vez. Después del último lavado, vacíe los pocillos golpeando la placa sobre un tejido absorbente.

Adición de conjugado
Añada 100 µl de conjugado a cada pocillo.
Incube durante 30 minutos.

Después de la incubación del conjugado
Lave como antes.

Adición de solución sustrato
Añada 100 µL de sustrato TMB a cada pocillo e incube a oscuras durante 15 minutos. El tiempo de incubación puede reducirse a 10 minutos si el DO máximo supera 3,0 a altas temperaturas o si se utiliza un método automatizado.

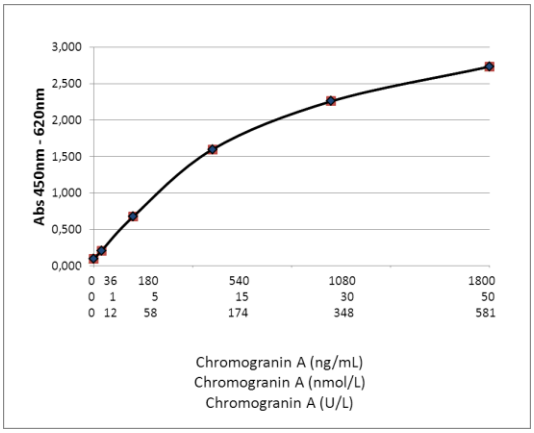
Adición de la solución de parada
Añada 100 µl de solución de parada a cada pocillo. Lea la absorbancia a 450 nm a las 2 horas en un lector de microplacas. Lea a 620 nm como longitud de onda de referencia.

Cálculos
Construya una curva calibradora representando la DO frente a los valores de nmol/l de los seis calibradores. Los seis calibradores incluidos tienen valores de 0 ng/mL para el calibrador 1, 36 ng/mL para el calibrador 2, 180 ng/mL para el calibrador 3, 540 ng/mL para el calibrador 4, 1080 ng/mL para el calibrador 5 y 1800 ng/mL para el calibrador 6, respectivamente. Lea los valores de los controles bajo y alto y las muestras del paciente a partir de la curva.

Los valores mayores que el valor del calibrador superior deben indicarse como >1.800 ng/mL o diluirse más con el diluyente del ensayo y volver a analizarse. En este caso, debe tenerse en cuenta la compensación de la dilución en el cálculo de la concentración de cromogranina A. En caso de que los valores del calibrador 1 o el calibrador 6 estén fuera de rango, la prueba no se considerará válida y deberá repetirse.

Para mayor comomdidad, las concentraciones pueden calcularse en ng/mL, nmol/L o U/L. Todas las unidades se indican en la tabla siguiente. El peso molecular del fragmento nativo de cromogranina A (36kDa) se usó para la convesión (Stridsberg, M et al. 1993, Stridsberg et al. 1995)

Calibrador	Concentración			Absorbancia
	ng/mL	nmol/L	U/L	
1	0	0	0	0.094
2	36	1	12	0.209
3	180	5	58	0.678
4	540	15	174	1.599
5	1080	30	348	2.259
6	1800	50	581	2.735



Una muestra con un valor de absorbancia de 1,272 se leerá en el eje X como con 367 ng/mL (o 10,2 nmol/, 0,118 U/L) de cromogranina A. En este ejemplo, se ha aplicado una curva logística de 4 parámetros.
Importante: La curva es un ejemplo y no debe usarse para la interpretación real de la muestra de un paciente.

Control de calidad
La DO para el calibrador 1 debe ser < 0,15
La DO del calibrador 6 debe ser > 1,0
Los valores de los controles alto y bajo, consulte el certificado del lote.
Los controles están pensados para vigilar un fracaso sustancial de un reactivo. Si cualquiera de los valores de control no está dentro de su intervalo respectivo, la prueba debe considerarse no válida y debe repetirse.
Podrían estudiarse controles adicionales de acuerdo con las directrices o requisitos de las normas locales, estatales y/o federales o las organizaciones de acreditación. Consulte el documento NCCLS C24-A para orientación sobre prácticas adecuadas de CC.

Efecto de gancho
No se ha observado efecto de gancho en ensayos de concentraciones de cromogranina A hasta 360 000 ng/mL (o 10 000 nmol/L, o 116 000 U/L)

LIMITACIONES
El nivel de cromogranina A de un determinado paciente no debe usarse por sí solo como medida de la intensidad de la enfermedad. No se debe utilizar la prueba como única base para la toma de decisiones en el tratamiento clínico, sino que debe utilizarse en combinación con los síntomas clínicos y los resultados de otras pruebas disponibles.

Interferencia
No se detectaron interferencias cuando se inacularon muestras de plasma con bilirrubina F (208 mg/L), bilirrubina C (200 mg/L), hemoglobina hemolítica (4,84 g/L) o quilo (1430 FTU). Las personas que reciben anticuerpos de ratón antihumanos para tratamiento o diagnóstico, o aquellos que se han expuesto de algún otro modo a la inmunoglobulina de ratón, pueden producir anticuerpos humanos antirratón (HAMA). Estos anticuerpos pueden interferir en los ensayos que usen más anticuerpos monoclonales de ratón y ocasionar niveles elevados falsos.

Resultados esperados
Se recomienda que cada laboratorio establezca un rango de referencia con las muestras que utilice normalmente, ya que las variaciones en la manipulación de las muestras pueden afectar a los resultados. Debe seguirse una estricta rutina de manipulación de las muestras, como se recomienda más arriba. Los siguientes valores son una indicación del rango de referencia esperado y se calculan como el percentil 97,5 de 126 muestras de plasma heparinizado de donantes de sangre (63 hombres y 63 mujeres).

Nivel de plasma heparinizado del rango de referencia de la cromogranina A: ≤ 108 ng/mL (o 3,0 nmol/L, o 35 U/L).

Límite de detección
El límite de detección de este ensayo es de 19 ng/mL (o 0,54 nmol/L, o 6 U/L). Es la menor concentración detectable diferente de cero con una probabilidad del 95%. Significa que es posible realizar mediciones fiables incluso en muestras negativas hasta este punto. El cálculo se ha realizado de acuerdo con las orientaciones de NCCLS EP17-A vol. 24 n.º 34.

Aumentos de cromogranina A no relacionados con tumores
Es posible observar aumentos en los niveles de cromogranina A en pacientes con una función renal disminuida, en pacientes con gastritis atrófica y en pacientes sometidos a tratamiento con fármacos inhibidores de la bomba de protones.

CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES

Tabla 1. Sensibilidad y especificidad clínicas.

Sensibilidad clínica
Se ensayó un total de 107 muestras de plasma heparinizado con caracterización clínica. The following table summarises the results

Grupos de enfermedad	Número total	Positivo >3,0 nmol/L	Negativo ≤ 3,0 nmol/L	Sensibilidad %
TEC	4	3	1	75
TPE	30	19	11	63
CIA	10	7	3	70
CP	9	4	5	44
CIM	47	28	19	60
Dif NE	6	2	4	33
Paraganglioma	1	1	0	100

TEC = Tumores de tipo enterocromafínico
TPE = Tumor del páncreas endocrino
CIA = Carcinoide del intestino anterior
CP = Carcinoide de pulmón
CIM = Carcinoide del intestino medio
Dif NE = Diferenciación neuroendocrina

Especificidad
Se analizaron 126 muestras de plasma heparinizado de donantes de sangre aparentemente sanos, 126 muestras fueron negativas:

126/126 = 100% 95% CI = 97,1% - 100%

El intervalo de confianza (IC) del 95% se calculó usando el método exacto.

Tabla 2. La precisión entre ensayos se determinó estudiando seis pruebas diferentes en ocho réplicas en tres ocasiones distintas.

	1	2	3	4	5	6
Valor medio (ng/mL)	150	209	316	486	838	1212
DE	14,0	10,8	28,3	41,7	80,6	69,8
% CV	9	5	9	9	10	6

Tabla 3. La precisión entre ensayos se determinó estudiando seis pruebas diferentes en ocho réplicas en una ocasión.

	1	2	3	4	5	6
Valor medio (ng/mL)	156	214	335	502	868	1255
DE	6,4	11,3	10,4	23,3	42,8	101,4
% CV	4	5	3	5	5	8

Tabla 4. La variación entre lotes se determinó estudiando seis muestras distintas en ocho réplicas en tres lotes diferentes.

	1	2	3	4	5	6
Valor medio (ng/mL)	145	205	309	459	794	1165
DE	9,6	7,8	22,9	38,5	69,2	78,1
% CV	7	4	7	8	9	7

Tabla 5. La recuperación de dilución se determinó estudiando cinco diluciones seriadas para tres muestras diferentes.

Muestra	**Dilución**	**Concentración media medida (ng/mL)**	**Concentración calculada (ng/mL)**	**% de recuperación corregida por dilución**
1	1/5	1540	1540	100
	1/10	756	770	98
	1/20	366	385	95
	1/40	179	193	93
	1/80	90	96	94
Muestra	**Dilución**	**Concentración media medida (ng/mL)**	**Concentración calculada (ng/mL)**	**% de recuperación corregida por dilución**
2	1/5	1134	1134	100
	1/10	587	567	104
	1/20	278	283	98
	1/40	139	142	98
	1/80	72	71	101
Muestra	**Dilución**	**Concentración media medida (ng/mL)**	**Concentración calculada (ng/mL)**	**% de recuperación corregida por dilución**
3	1/5	1293	1293	100
	1/10	625	646	97
	1/20	292	323	90
	1/40	144	162	89
	1/80	76	81	94

SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Problema	Posibles causas	Acción correctora
Uno o más calibradores fuera de rango.	1. No se han añadido uno o varios reactivos, o se han añadido en la secuencia incorrecta. 2. Pipeteado incorrecto.	1. Prueba no válida. Repita la prueba. 2. Prueba no válida. Repita la prueba.
Valores de control fuera de rango.	1. Temperatura, temporización o pipeteado incorrecto; los reactivos no se han mezclado. 2. Contaminación cruzada de los controles. 3. Dilución incorrecta. 4. La vía óptica no está limpia.	1. Compruebe que el tiempo y la temperatura sean correctos. Consulte ”Mala precisión” a continuación. Repita la prueba. 2. Pipetear con cuidado. 3. Repita la prueba. 4. Compruebe que no haya suciedad ni burbujas en los pocillos. Limpie el fondo de la placa y vuelta a tomar la lectura.
Resultados en blanco de todas las pruebas.	1. No se han añadido uno o varios reactivos, o se han añadido en la secuencia incorrecta. 2. Placa recubierta inactiva.	1. Compruebe el procedimiento. Compruebe si hay reactivo sin usar. Repita la prueba. 2. Compruebe si hay humedad visible en los pocillos sin usar. Limpie el fondo de la placa y vuelta a tomar la lectura.
Resultados en amarillo de todas las pruebas.	1. Tampón o reactivos contaminados. 2. Solución de lavado contaminada. 3. Dilución incorrecta del suero.	1. Compruebe la turbidez o el mal olor de todas las soluciones. 2. Use un recipiente limpio. Compruebe la calidad de la solución de agua usada para prepararla. 3. Repita la prueba.
El OD máximo es elevado (supera 3,0)	1. Temperatura de incubación demasiado alta/uso de método automático.	1. Reduzca el tiempo de incubación para el sustrato.
Mala precisión.	1. CV de entrega de la pipeta superior al 5%. 2. La muestra o los reactivos no se han mezclado lo suficiente o no están equilibrados a la temperatura ambiente. 3. La adición del reactivo tarda mucho; inconsistencia en los intervalos de tiempo. 4. La vía óptica no está limpia.	1. Compruebe la calibración de la pipeta. Use una técnica reproducible. 2. Mezcle bien pero con suavidad todos los reactivos y equilibrar a la temperatura ambiente. 3. Desarrolle una técnica uniforme y consistente y use un dispositivo con varias puntas o un dispensador automático para reducir el tiempo. 4. Compruebe que no haya burbujas en los pocillos. Limpie el fondo de la placa y vuelta a tomar la lectura.

	5. Lavado no consistente; burbujas atrapadas; queda solución de lavado en los pocillos.	5. Compruebe que todos los pocillos se llenen y aspiren uniformemente. Vierta líquido por encima del nivel de reactivo en el pocillo. Después del último lavado, vacíe los pocillos golpeando la placa sobre un tejido absorbente.
	6. Pipeteado incorrecto.	6. Evite burbujas de aire en las puntas de la pipeta.

REFERENCIAS

1. Bajetta, E., Ferrari, L., Martinetti, A., Celio, L., Procopio, G., Artale, S., Zilembo, N., Di Bartolomeo, M., Seregni, E. and Bombardieri, E.
Chromogranin A, neuron specific enolase, carcinoembryonic antigen, and hydroxyindole acetic acid evaluation in patient with neuroendocrine tumours.
*Cancer 1999, **86:**858-865.*

2. Eriksson, B., Öberg, K. and Stridsberg, M.
Tumour markers in neuroendocrine tumours.
*Digestion 2000, **62:**33-38.*

3. O'Connor, D.T. and Deftos, L.J.
Secretion of chromogranin A by peptide-producing endocrine neoplasms.
New England Journal of Medicine1986, **314:**1145-1151.

4. Stridsberg, M., Hellman, U., Wilander, E., Lundqvist, G., Hellsing, K. and Öberg, K.
Fragments of chromogranin A are present in the urine of patients with carcinoid tumours: Development of a specific radioimmunoassay for chromogranin A and its fragments.
*Journal of Endocrinology 1993, **139:**329-337.*

5. Stridsberg, M., Öberg, K., Li, Q., Engström, U. and Lundqvist, G.
Measurements of chromogranin A, chromogranin B (secretogranin I), chromogranin C (secretogranin II) and pancreastatin in plasma and urine from patients with carcinoid tumours and endocrine pancreatic tumours.
*Journal of Endocrinology 1995, **144:**49-59.*

6. Stridsberg, M.
Measurements of chromogranins and chromogranin-related peptides by immunological methods.
*Advanced Experimental and Medical Biology 2000, **482:**319-327.*

7. Winkler, H. and Fischer-Colbrie, R.
The chromogranin A and B: The first 25 years and future perspectives.
*Neuroscience 1992, **49:**497-528.*

EXPLICACIÓN DE SÍMBOLOS

Ag	Antígeno (placa recubierta).
DIL	Diluyente.
BUF **CONJ**	Tampón de conjugado.
CONJ **100X**	Conjugado HRP 100x de conc.
BUF **WASH** **20X**	Tampón de lavado concentrado 20x.
SUBS **TMB**	Solución TMB (solución substrato).
H_2SO_4 **0.5M**	Ácido sulfúrico, 0,5 molar (solución de parada).
CAL **X** **LYO**	Calibrador liofilizado.
CONTROL **L** **LYO**	Control bajo liofilizado.
CONTROL **H** **LYO**	Control alto liofilizado.

	Número de lote.
	Número de catálogo.
	Fecha de caducidad.
	Límites de temperatura.
	Riesgo biológico.
	Consulte las instrucciones de uso.
	Producto sanitario para diagnóstico in vitro.
	Fabricante.
	Atensión.
96	Contenido suficiente para 96 pruebas.
	La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro.

CgAnalyze Kit

DEUTSCH

VERWENDUNGSZWECK

Das Kit CgAnalyze ist ein enzymgebundener Immunosorbent-Test (ELISA) zum Nachweis und zur Quantifizierung des Chromogranin A im menschlichen Plasma oder Serum. Die Testergebnisse können für die Diagnose von Chromogranin A-sezernierenden neuroendokrinen Tumoren (NETs) wie Pheochromozytome und Karzinoide herangezogen werden. Das Assay ist für Patienten, die Anzeichen und Symptome eines NETs aufweisen, vorgesehen. Es nicht für das Screening einer gesunden Population gedacht.
Die Untersuchung darf nur von ausgebildetem Laborpersonal durchgeführt werden.

NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Chromogranine und Sekretogranine bilden eine Familie einzigartiger saurer Proteine, die zusammen mit Neurotransmittern und Peptidhormonen im Gehirn und dem diffusen neuroendokrinen System gespeichert sind (Winkler, H. & Fischer-Colbrie, R.1992). Diese Proteine stammen strukturell von verschiedenen Genen, haben aber einige allgemeine Eigenschaften, wie beispielsweise eine Reihe saurer Aminosäurereste und mehrere Paare basischer Aminosäuren als mögliche Orte posttranslationaler Spaltung, gemeinsam. Chromogranine werden zusammen mit Neuropeptiden und Hormonen in den neuroendokrinen Zellen des ganzen Körpers gespeichert und sezerniert. Es wird vermutet, dass eine Rolle des Chromogranins in der Bildung hormoneller Granula und Hormongruppen besteht. Zudem können Chromogranine in kleinere Fragmente gespalten werden, die biologische Aktivitäten wie Hemmung der Hormonsekretion, Vasodilatation und antimikrobielle Wirkungen entwickeln können (Stridsberg M, 2000).

Tumore neuroendokrinen Ursprungs gehen normalerweise mit erhöhten Serum-/Plasmaspiegeln von Chromogranin A einher (O'Connor, DT, Deftos LJ, 1986) und stammen von neuroendokrinen Zellen ab. Typische neuroendokrine Tumore sind Karzinoide, Pheochromozytome, Neuroblastome, kleinzellige Lungenkarzinome, Parathyroidadenome, Hypophysentumor, Prostatakarzinome und Inselzelltumore des Pankreas sowie das MEN1- und MEN2-Syndrom. Hierzu gehören ebenfalls die verschiedenen neuroendokrinen Tumorsyndrome wie die Gastrinome, Insulinome, Glucagonome, Somatostatinome, PPome und die nicht-funktionellen neuroendokrinen Tumore (Eriksson, B. u. a. 2000). Chromogranin A hat sich für diese Tumore als der beste im Blut zirkulierende Marker erwiesen (Bajetta, E. u. a. 1999).

Prinzip des CgAnalyze Kit

In einer separaten Verdünnungsplatte werden Patientenproben, Kalibratoren und Kontrollen 5fach mit Verdünnungspuffer verdünnt. Das verdünnte Material wird dann in den Mikrotiterplatten übertragen und bei Raumtemperatur 60 Minuten inkubiert. Bei dieser ersten Inkubation bindet ein monoklonaler Antikörper das Chromogranin A an die Kavitätenoberfläche. Nach einem Waschschritt zum Entfernen nicht gebundenen Materials wird ein zweiter, mit Meerrettichperoxidase markierter monoklonaler Antikörper hinzugefügt, der das in der Kavität gebundene Chromogranin A detektiert. Nach einer Inkubation von 30 Minuten werden die Kavitäten noch einmal gewaschen, ein Farbsubstrat hinzugefügt und inkubiert. Die Farbentwicklung wird nach 15 Minuten gestoppt und die Farbintensität in einem Spektralfotometer gemessen. Die Farbintensität ist direkt proportional zu der Menge in der Kavität gebundenen Chromogranin A. Quantifiziert wird das Chromogranin durch den Vergleich mit der Farbentwicklung der Kalibratorproben.

Der Kalibrator des Kits ist ein synthetisches Peptid, dass dem Chromogranin A entspricht. Der Peptidkalibrator ist so eingestellt, dass seine Reaktion der eines gereinigten nativen Fragments Chromogranin A entspricht (Stridsberg, M. u. a. 1993, Stridsberg u. a. 1995).

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- In-vitro-Diagnostikum
- Die Assay-Reagenzien enthalten keine Humanserumkomponenten, doch müssen die Patientenplasmen wie potenziell infektiöses Material behandelt werden.
- Die „Centers for Disease Control and Prevention" und das „National Institutes of Health" empfehlen, potenziell infektiöse Materialien nach Biosafety Level 2 zu behandeln.
- Die meisten Kit-Lösungen enthalten als Konservierungsmittel ProClin 300. Niemals mit dem Mund pipettieren oder Reagenzien bzw. Patientenproben mit der Haut in Berührung bringen. ProClin 300-haltige Reagenzien können reizend sein. Kontakt mit Haut und Augen vermeiden. Bei eventuellem Kontakt mit viel Wasser spülen.
- Die Stopplösung enthält 0,5 M Schwefelsäure. Hautkontakt mit dem Reagenz vermeiden.
- Die Konzentrationen Chromogranin A bestimmter Proben, die mit Tests anderer Hersteller bestimmt wurden, können aufgrund unterschiedlicher Testmethoden und Reagenzienspezifität voneinander abweichen.
- Sämtlicher Abfall ist als gefährlicher Abfall zu behandeln.
- Sicherheitsdatenblätter sind für alle in diesem Testkit enthaltenen gefährlichen Bestandteile auf Anfrage von Dako Denmark A/S erhältlich.

Achtung

CAL	X	LYO
DIL		
CONJ	100X	

CONTROL	L	LYO
CONTROL	H	LYO

Enthält ProClin 300:
Reaktionsmasse aus: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317:	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
P264:	Nach Gebrauch die Hände gründlich waschen.
P280:	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz verwenden.
P302+352:	BEI HAUT KONTAKT: Mit sehr viel Seife und Wasser waschen.
P333+313:	Im Falle einer Hautreizung oder -ausschlags: Ärztlichen Rat einholen, bzw. zur Kenntnis bringen.

PROBENENTNAHME

Für das CgAnalyze Kit wird Serum/EDTA-/Heparinplasma empfohlen.
Proben als potenziell infektiös handhaben.
Die Proben können nach dem Zentrifugieren und Abseren bei 2-8 °C bis zu 7 Tage gelagert werden. Falls die Proben eine längere Zeit aufbewahrt werden sollen, bei -20 °C oder kälter lagern. Proben können ohne Veränderung 3-mal eingefroren und wieder aufgetaut werden. Keinen Gefrierschrank mit No-Frost-System verwenden, da die Proben dort Auftau-Einfrier-Zyklen unterworfen sein können, welche die Antikörper abschwächen. Proben, die nicht richtig gelagert oder mehrfachen Auftau-Einfrier-Zyklen unterworfen sind, können falsche Ergebnisse ergeben.

KITKOMPONENTEN UND REAGENZIENLAGERUNG
- Ein Rahmen mit 96 Kavitäten, in Folienverpackung mit Trockenmittel verschweißt.
- Sechs Fläschchen lyophilisierte Kalibratoren mit humanem Chromogranin A in Verdünnungspuffer. CAL 1 = 0 ng/ml (Verdünnungspuffer), CAL 2 = 36 ng/mlL, CAL 3 = 180 ng/ml, CAL 4 = 540 ng/ml, CAL 5 = 1080 ng/ml, CAL 6 = 1800 ng/ml.
- Ein Fläschchen lyophilisierte Kontrolle, niedrig (LC), grüne Farbe.
- Ein Fläschchen lyophilisierte Kontrolle, hoch (HC), rote Farbe.
- 30 ml Verdünnungspuffer (DIL) mit Biotin-markierten Antikörpern gegen Chromogranin A, rot. Gebrauchsfertig.
- 150 µl Konjugat (CONJ) mit HRP-markierten Antikörpern gegen Chromogranin A, 100fach konzentriert
- 15 ml Konjugatpuffer (blau). Gebrauchsfertig.
- 15 ml Substrat TMB. Gebrauchsfertig.
- 15 ml Stopplösung (0,5 M H_2SO_4). Gebrauchsfertig.
- 2 x 35 ml Waschlösung, 20fach konzentriert

Vor Gebrauch
Lyophilisierte Kalibratoren und Kontrollen sorgfältig in 300 µl destilliertem Wasser auflösen. Nach Gebrauch die rekonstituierten Kalibratoren und Kontrollen bei -20 °C oder darunter lagern. Kalibratoren und Kontrollen können ohne Veränderung 3-mal eingefroren und wieder aufgetaut werden.
Alle anderen Reagenzien des Kits bei 2-8 °C lagern.
Rekonstituierte Kalibratoren und Kontrollen für jeden Testlauf mit Verdünnungspuffer 5fach verdünnen.
Die für jede Analyse erforderliche Menge Konjugat vor Gebrauch 100fach verdünnen (10 µl Konjugat + 990 µl Konjugatpuffer je Streifen).
Übrig gebliebenes Konjugat muss verworfen werden.
Vor Gebrauch die Waschlösung 20fach verdünnen. Dafür 10 ml der 20fach konzentrierten Waschlösung in 190 ml destilliertem Wasser verdünnen. Die verdünnte Waschlösung ist bei einer Lagerung bei 2-8 °C bis zum Verfallsdatum des Kits haltbar.
Alle anderen Reagenzien des Kits sind gebrauchsfertig.
Entnehmen Sie nur die Anzahl Kavitäten, die zum Testen benötigt werden. Die Aluminiumverpackung wieder sorgfältig verschließen.

Nicht mitgelieferte, aber erforderliche Materialien bzw. Geräte
- Lesegerät für Mikrotiterplatten mit Filter 450 nm. Referenzwellenlänge 620 nm
- 300 µl/Kavität Verdünnungsplatte zur Verdünnung von Kalibratoren, Patientenproben und Kontrollen
- Präzisionspipetten mit Einmalspitzen
- Automatischer Mikrotiterplattenwascher, saugfähige Papiertücher, Röhrchen und ein Kurzzeitwecker.

VERFAHREN
Alle Lösungen müssen Raumtemperatur haben. Alle Schritte bei Raumtemperatur (20-30 °C) inkubieren.

Probenverdünnung und Inkubation
Vor dem Übertragen auf die Testplatte alle Proben in einer separaten Verdünnungsplatte 5fach verdünnen. Kalibratoren, niedrige und hohe Kontrolle sowie Patientenplasma wie folgt verdünnen: 50 µl Plasma + 200 µl Verdünnungspuffer. Mit der Pipette gut mischen und nach der Tabelle unten im Doppelansatz je 100 µl in die Testplatte übertragen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CAL1	CAL5	P1									
B	CAL1	CAL5	P1									
C	CAL2	CAL6	P2									
D	CAL2	CAL6	P2									
E	CAL3	H	usw.									
F	CAL3	H										
G	CAL4	L										
H	CAL4	L										

60 Minuten inkubieren.

Nach der Probeninkubation
Dreimal mit 300 µl Waschlösung/Kavität waschen, dafür die Kavitäten jedes Mal füllen und dekantieren. Nach dem letzten Waschen die Kavitäten durch Klopfen die Mikrotiterplatte auf saugfähigen Zellstoff leeren.

Konjugat hinzufügen
In jede Kavität 100 µl Konjugat pipettieren.
30 Minuten inkubieren.

Nach Konjugatinkubation
Wie oben beschrieben waschen.

Substratlösung hinzufügen
In jede Kavität 100 µl Substrat TMB hinzufügen und im Dunkeln 15 Minuten inkubieren. Die Inkubationszeit kann auf 10 Minuten verkürzt werden, wenn bei hohen Temperaturen die maximale OD 3,0 überschreitet oder bei Verwendung automatisierter Verfahren.

Stopplösung hinzufügen
In jede Kavität 100 µl Stopplösung pipettieren. Die Extinktion innerhalb von 2 Stunden bei 450 nm mit einem Lesegerät für Mikrotiterplatten ablesen. Bei 620 nm als Referenzwellenlänge ablesen.

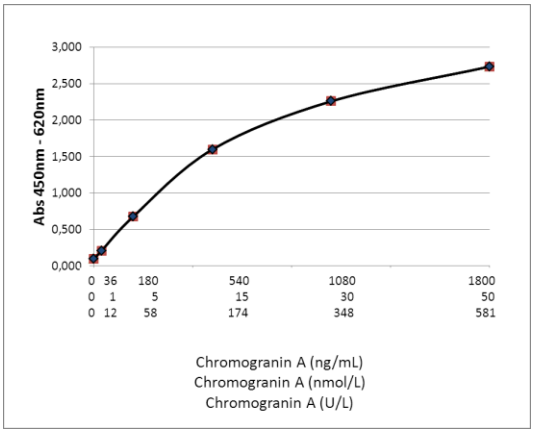
Berechnungen
Zeichnen Sie eine Kalibrationskurve, indem Sie die OD gegen die ng/ml -Werte der sechs Kalibratoren auftragen. Die sechs mitgelieferten Kalibratoren haben folgende Werte: 0 ng/ml für Kalibrator 1, 36 ng/ml für Kalibrator 2, 180 ng/ml für Kalibrator 3, 540 ng/ml für Kalibrator 4, 1080 ng/ml für Kalibrator 5 und 1800 ng/ml für Kalibrator 6. Lesen Sie die Werte der niedrigen und hohen Kontrolle sowie der Patientenproben aus der Kurve ab.

Werte über dem höchsten Kalibrator müssen entweder als >1800 ng/ml angegeben oder mit Assay-Verdünnungspuffer verdünnt und erneut getestet werden. In diesem Fall muss der Verdünnungsfaktor in die Berechnung der Chromogranin A-Konzentration mit einbezogen werden. Bitte beachten Sie, dass für den Fall, dass Kalibrator 1 oder 6 außerhalb des Messbereichs liegen, der Test ungültig ist und wiederholt werden muss.

Zur Vereinfachung können die Konzentrationen in mg/ml, nmol/l oder U/L berechnet werden. Alle Einheiten sind in der Tabelle unten angegeben. Für diese Umrechnung wurde das Molekulargewicht des nativen Fragments von Chromogranin A (36kDa) verwendet (Stridsberg, M. et al. 1993, Stridsberg et al. 1995).

Beispiel

Kalibrator	Konzentration			Extinktion
	ng/mL	nmol/L	U/L	
1	0	0	0	0,094
2	36	1	12	0,209
3	180	5	58	0,678
4	540	15	174	1,599
5	1080	30	348	2,259
6	1800	50	581	2,735



Eine Probe mit einem Extinktionswert von 1,272 wird auf der X-Achse mit einem Wert von 367 ng/ml (bzw. 10,2 nmol/l, bzw 118 U/L) Chromogranin A abgelesen. In diesem Beispiel wurde die Kurve mit einer 4-Parameter-Logistic erstellt.
Wichtig: Die Kurve ist als Beispiel gedacht und darf nicht für die Auswertung von Patientenproben verwendet werden.

Qualitätskontrolle
Die OD für Kalibrator 1 muss <0,15 liegen.
Die OD für Kalibrator 6 muss >1,0 liegen.
Für die Werte der niedrigen und hohen Kontrolle siehe Chargenzertifikat.
Die Kontrollen dienen zur Überwachung von Reagenzienversagen erheblicher Natur. Sollten sich Kontrollwerte außerhalb ihres entsprechenden Bereichs befinden, ist der Test ungültig und muss wiederholt werden. Zusätzliche Kontrollen können nach den Richtlinien oder Vorschriften regionaler und/oder staatlicher Verordnungen bzw. von Zulassungsorganisationen analysiert werden. Siehe NCCLS C24-A für Informationen über entsprechende Verfahren zur Qualitätskontrolle.

Hook-Effekt
Beim Testen von Konzentrationen Chromogranin A bis zu 360 000 ng/ml
(bzw. 10 000 nmol/l, 116 000 U/L) konnte kein Hook-Effekt beobachtet werden.

EINSCHRÄNKUNGEN
Der Chromogranin A-Spiegel eines einzelnen Patienten alleine kann nicht als Maß der Krankheitsschwere gelten. Für eine klinische Therapie darf dieser Test alleine keine Entscheidungsgrundlage bilden, sondern muss immer zusammen mit klinischen Symptomen und Ergebnissen anderer verfügbarer Tests gesehen werden.

Interferenz
Bei Versetzen von Plasmaproben mit Bilirubin F (208 mg/l) , Bilirubin C (200 mg/l), hämolytischem Hämoglobin (4,84 g/l) oder Chylus (1430 FTU) wurden keine Interferenzen festgestellt.
Personen, die zur Behandlung oder Diagnose Anti-Human-Antikörper der Maus erhalten haben, oder Patienten, die auf andere Weise gegen Immunglobine der Maus exponiert waren, können humane Anti-Maus-Antikörper (HAMA) bilden. Diese Antikörper können

Tests, die monoklonale Antikörper von der Maus verwenden, stören und falsch erhöhte Werte verursachen.

Erwartete Ergebnisse

Es wird empfohlen, dass jedes Labor mit den am häufigsten verwendeten Proben seinen eigenen Referenzbereich erstellt, da Unterschiede in der Probenhandhabung die Ergebnisse beeinflussen können. Es sollte, wie oben beschrieben, eine konsequente Handhabung der Proben eingehalten werden. Die unten angegebenen Werte sind ein Hinweis auf den erwarteten Referenzbereich und wurden als das 97,5-Percentil von 126 Proben von Blutspendern (63 Männer und 63 Frauen) errechnet.

Referenzbereich von Chromogranin A (Heparinplasma): ≤ 108 ng/ml (bzw. <3,0 nmol/l, bzw < 35 U/L).

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze dieses Assays beträgt 19 ng/ml (bzw. 0,54 nmol/l, bzw. 6 U/L). Das ist die kleinste nachweisbare Konzentration, die mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % von null abweicht. Das bedeutet, dass bis zu diesem Messpunkt sogar bei negativen Proben zuverlässige Messungen erzielt werden können. Die Berechnung wurde gemäß der NCCLS-Richtlinie EP17-A Vol. 24 No. 34 durchgeführt.

Tumorunabhängige Erhöhung des Chromogranin A

Erhöhte Chromogranin A-Spiegel können bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion, atropher Gastritis und bei Patienten, die mit Protonenpumpenhemmer therapiert werden, auftreten.

LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

Tabelle 1. Klinische Sensitivität und Spezifität

Klinische Sensitivität

Es wurden insgesamt 107 Heparinplasmaproben mit klinischen Eigenschaften getestet. Die folgende Tabelle fasst die Ergebnisse zusammen.

Krankheitsgruppen	Gesamt-menge	Positiv >3,0 nmol/l	Negativ ≤ 3,0 nmol/l	Empfindlichkeit %
ECL	4	3	1	75
EPT	30	19	11	63
FGC	10	7	3	70
LC	9	4	5	44
MGC	47	28	19	60
NE Diff	6	2	4	33
Paragangliom	1	1	0	100

ECL = Enterochromaffin-like-Zell-Tumore
EPT = Endokriner Pankreastumor
FGC = Forgut-Karzinoid
LC = Lungenkarzinoid
MGC = Midgut-Karzinoid
NE Diff = Neurokrine Differenzierung

Spezifität
126 Heparinplasmaproben von anscheinend gesunden Blutspendern wurden getestet, 126 Proben waren negativ:
126/126 = 100 % 95%-CI = 97,1%-100%

Der 95-%-Vertrauensbereich (CI) wurde mit der exakten Methode errechnet.

Tabelle 2. Inter-Assay-Präzision wurde durch Testen sechs verschiedener Proben in achtfachem Ansatz in drei verschiedenen Testläufen bestimmt.

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Mittelwert (ng/ml)	150	209	316	486	838	1212
SA	14,0	10,8	28,3	41,7	80,6	69,8
% VK	9	5	9	9	10	6

Tabelle 3. Intra-Assay-Präzision wurde durch Testen sechs verschiedener Proben in achtfachem Ansatz in einem Testdurchlauf bestimmt.

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Mittelwert (ng/ml)	156	214	335	502	868	1255
SA	6,4	11,3	10,4	23,3	42,8	101,4
% VK	4	5	3	5	5	8

Tabelle 4. Präzision von Charge zu Charge wurde durch Testen sechs verschiedener Proben in achtfachem Ansatz mit drei verschiedenen Chargen bestimmt.

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Mittelwert (ng/ml)	145	205	309	459	794	1165
SA	9,6	7,8	22,9	38,5	69,2	78,1
% VK	7	4	7	8	9	7

Tabelle 5. Wiederfindung der Verdünnung wurde durch Testen von 5 Reihenverdünnungen von 3 verschiedenen Proben bestimmt.

Probe	**Verdünnung**	**Mittelwert der gemessenen Konzentration (ng/ml)**	**Errechnete Konzentration (ng/ml)**	**Verdünnungs-bereinigte (%) Wiederfindung**
1	1/5	1540	1540	100
	1/10	756	770	98
	1/20	366	385	95
	1/40	179	193	93
	1/80	90	96	94
Probe	**Verdünnung**	**Mittelwert, gemessene Konzentration (ng/ml)**	**Errechnete Konzentration (ng/ml)**	**Verdünnungs-bereinigte (%) Wiederfindung**
2	1/5	1134	1134	100
	1/10	587	567	104
	1/20	278	283	98
	1/40	139	142	98
	1/80	72	71	101
Probe	**Verdünnung**	**Mittelwert, gemessene Konzentration (ng/ml)**	**Errechnete Konzentration (ng/ml)**	**Verdünnungs-bereinigte (%) Wiederfindung**
3	1/5	1293	1293	100
	1/10	625	646	97
	1/20	292	323	90
	1/40	144	162	89
	1/80	76	81	94

FEHLERSUCHE

Problem	Mögliche Ursachen	Abhilfemaßnahme
Ein Kalibrator oder mehrere außerhalb des Messbereichs	1. Es wurden ein oder mehrere Reagenzien nicht oder in der falschen Reihenfolge hinzugefügt. 2. Falsches Pipettieren.	1. Test ungültig. Test wiederholen. 2. Test ungültig. Test wiederholen.
Kontroll-werte außerhalb des Messbereichs	1. Falsche Temperatur, falscher Zeitablauf oder falsch pipettiert, Reagenzien nicht gemischt. 2. Kreuzkontamination der Kontrollen. 3. Falsche Verdünnung. 4. Strahlengang nicht sauber.	1. Überprüfen, ob Zeit und Temperatur korrekt waren. Siehe "Schlechte Präzision" weiter unten. Test wiederholen. 2. Sorgfältig pipettieren. 3. Test wiederholen. 4. Auf Verschmutzung oder Luftblasen in den Kavitäten prüfen. Unterseite der Platte abwischen und erneut ablesen.
Alle Test-ergebnisse ohne Farbent-wicklung.	1. Es wurden ein oder mehrere Reagenzien nicht oder in der falschen Reihenfolge hinzugefügt. 2. Beschichtete Platte inaktiv.	1. Testablauf überprüfen. Auf nicht verwendetes Reagenz überprüfen. Test wiederholen. 2. Auf sichtbare Feuchtigkeit in nicht benutzten Kavitäten prüfen. Unterseite der Platte abwischen und erneut ablesen.
Alle Test-ergebnisse gelb.	1. Kontaminierte Puffer oder Reagenzien. 2. Waschlösung kontaminiert. 3. Falsche Serumverdünnung.	1. Alle Lösungen auf Trübung oder fauligen Geruch prüfen. 2. Sauberen Behälter verwenden. Überprüfen Sie die Qualität des Wassers, mit der die Lösung hergestellt wurde. 3. Test wiederholen.
Maximale OD ist erhöht (über 3,0)	1. Zu hohe Inkubationstemperaturen/Auto-matisiertes Verfahren angewendet.	1. Inkubationstemperatur für Substrat senken.
Schlechte Präzision	1. VK der Pipettenabgabe über 5 %. 2. Serum oder Reagenzien nicht ausreichend gemischt oder nicht auf Raumtemperatur. 3. Hinzugeben des Reagenzes dauert zu lange, Zeitintervalle nicht einheitlich. 4. Strahlengang nicht sauber.	1. Pipettenkalibrierung überprüfen. Mit reproduzierbarer Technik arbeiten. 2. Alle Reagenzien sanft aber gründlich mischen und auf Raumtemperatur bringen. 3. Eine einheitliche Technik erstellen und Multipette oder Auto-dispenser verwenden, um Zeit zu sparen. 4. Kavitäten auf Luftblasen überprüfen. Unterseite der Platte abwischen und erneut ablesen.

	5. Uneinheitliches Waschen, eingeschlossene Luftblasen, Waschlösung in Kavitäten.	5. Überprüfen, ob alle Kavitäten gleichmäßig gefüllt und abgesaugt werden. Flüssigkeit in den Kavitäten über Reagenzienspiegel abgeben. Nach dem letzen Waschen die Kavitäten auf saugfähiges Papier gut abklopfen.
	6. Falsches Pipettieren.	6. Luftblasen in der Pipettenspitze vermeiden.

LITERATUR

1. Bajetta, E., Ferrari, L., Martinetti, A., Celio, L., Procopio, G., Artale, S., Zilembo, N., Di Bartolomeo, M., Seregni, E. and Bombardieri, E.
Chromogranin A, neuron specific enolase, carcinoembryonic antigen, and hydroxyindole acetic acid evaluation in patient with neuroendocrine tumours.
*Cancer 1999, **86:**858-865.*

2. Eriksson, B., Öberg, K. and Stridsberg, M.
Tumour markers in neuroendocrine tumours.
*Digestion 2000, **62:**33-38.*

3. O'Connor, D.T. and Deftos, L.J.
Secretion of chromogranin A by peptide-producing endocrine neoplasms.
*New England Journal of Medicine 1986, **314:**1145-1151.*

4. Stridsberg, M., Hellman, U., Wilander, E., Lundqvist, G., Hellsing, K. and Öberg, K.
Fragments of chromogranin A are present in the urine of patients with carcinoid tumours: Development of a specific radioimmunoassay for chromogranin A and its fragments.
*Journal of Endocrinology 1993, **139:**329-337.*

5. Stridsberg, M., Öberg, K., Li, Q., Engström, U. and Lundqvist, G.
Measurements of chromogranin A, chromogranin B (secretogranin I), chromogranin C (secretogranin II) and pancreastatin in plasma and urine from patients with carcinoid tumours and endocrine pancreatic tumours.
*Journal of Endocrinology 1995, **144:**49-59.*

6. Stridsberg, M.
Measurements of chromogranins and chromogranin-related peptides by immunological methods.
*Advanced Experimental and Medical Biology 2000, **482:**319-327.*

7. Winkler, H. and Fischer-Colbrie, R.
The chromogranin A and B: The first 25 years and future perspectives.
*Neuroscience 1992, **49:**497-528.*

ERKLÄRUNG DER SYMBOLE

Ag	Antigen (beschichtete Platte).
DIL	Verdünnungspuffer.
BUF **CONJ**	Konjugatpuffer.
CONJ **100X**	Konjugat HRP 100fach konz.
BUF **WASH** **20X**	Waschpuffer 20fach, Konzentrat.
SUBS **TMB**	TMB (Substratlösung).
H_2SO_4 **0.5M**	Schwefelsäure,0,5 M (Stopplösung).
CAL **X** **LYO**	Lyophilisierter Kalibrator.
CONTROL **L** **LYO**	Lyophilisierte Kontrolle, niedrig.
CONTROL **H** **LYO**	Lyophilisierte Kontrolle, hoch.

	Chargen-Nummer.
	Katalog-Nummer.
	Verfallsdatum.
	Temperaturbereich.
	Biologische Gefährdung.
	Gebrauchsanweisung beachten.
	In-vitro-Diagnostikum.
	Hersteller.
	Achtung.
	Inhalt ausreichend für 96 Tests.
	Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro-Diagnostika.

CgAnalyze Kit

ITALIANO

USO PREVISTO

Il Kit CgAnalyze è un dosaggio immunoassorbente legato ad enzima (ELISA) per il rilevamento e la quantificazione degli anticorpi di cromogranina A nel siero e nel plasma umano. I risultati del dosaggio possono essere utilizzati come aiuto nella diagnosi di cromogranina A nella secrezione di tumori neuroendocrini (NET), quali feocromocitomi e carcinoidi. Il dosaggio è inteso per l'utilizzo in pazienti con segni e sintomi coerenti con i NET. Non è previsto per lo screening su una popolazione sana.
L'analisi deve essere eseguita da professionisti di laboratorio esperti.

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO.

RIEPILOGO E SPIEGAZIONE

Le cromogranine e le secretogranine costituiscono una famiglia di sole proteine acide immagazzinate insieme ai neurotrasmettitori e agli ormoni peptidici nell'encefalo e nel sistema neuroendocrino diffuso (Winkler, H. & Fischer-Colbrie, R.1992). Queste proteine sono il prodotto di geni differenti ma posseggono alcune proprietà in comune, come l'abbondanza di aminoacidi con residui acidi e la presenza di alcune coppie di aminoacidi con residui basici che sono i siti potenziali per taglio post trascrizionale. Le cromogranine sono immagazzinate e secrete insieme ai neuropeptidi e agli ormoni dalle cellule neuroendocrine di tutto l'organismo; per esse è stato suggerito il ruolo di responsabili della formazione dei granuli contenenti gli ormoni immagazzinati. Inoltre, le cromogranine possono essere suddivise in frammenti più piccoli in grado di esercitare attività biologiche come l'inibizione della liberazione di certi ormoni, la vasodilatazione e l'azione anti batterica (Stridsberg M, 2000).

I tumori di origine neuroendocrina di solito presentano livelli circolanti aumentati di cromogranina A nel siero e nel plasma (O'Connor, DT, Deftos LJ, 1986). I tumori neuroendocrini derivano da cellule neuroendocrine; tumori tipici sono i tumori carcinoidi, i feocromocitomi, i neuroblastomi, i tumori polmonari a piccole cellule, gli adenomi iperparatiroidei, i tumori ipofisari, i tumori delle isole pancreatiche e le sindromi MEN 1 e MEN 2. In questi tumori sono compresi differenti sindromi da tumori neuroendocrini come i gastrinomi, gli insulinomi, i glucanomi, i somatostatinomi, i tumori secernenti il polipeptide pancreatico e i tumori neuroendocrini non secernenti (Eriksson, B. et al. 2000). Per questi tumori, la cromogranina A si è dimostrata essere il miglior marcatore presente in circolo (Bajetta, E. et al. 1999).

Principio di CgAnalyze Kit

Campioni, calibratori e controlli sono diluiti 5x nel diluente su una piastra di diluizione separata. Il materiale diluito viene trasferito su pozzetti di microtitolazione e incubato a temperatura ambiente per 60 minuti. Durante la prima incubazione, un anticorpo monoclonale attira la cromogranina A sulla superficie del pozzetto. Dopo il lavaggio per rimuovere il materiale non legato, si aggiunge un secondo anticorpo monoclonale marcato con perossidasi di rafano (HRP) per rilevare la cromogranina A legata al pozzetto. Dopo l'incubazione per 30 minuti i pozzetti vengono lavati nuovamente e si aggiunge un substrato di colore che viene incubato. Lo sviluppo cromatico viene interrotto dopo 15 minuti e il colore viene misurato nello spettrometro. Il colore è direttamente proporzionale alla quantità di cromogranina A legata al pozzetto. La quantità di cromogranina è determinata dal confronto con lo sviluppo cromatico dei campioni del calibratore.

Il calibratore nel kit è un peptide sintetico corrispondente alla cromogranina A. Il calibratore peptide previsto fornisce una risposta equivalente a un frammento originale depurato di cromogranina A (Stridsberg, M et al. 1993, Stridsberg et al. 1995)

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- Per uso diagnostico in vitro.
- I reagenti del dosaggio non contengono componenti del siero umano, ma il plasma del paziente analizzato dovrà essere manipolato come potenziale trasmettitore di agenti infettivi.
- I Centri per il controllo e la prevenzione delle malattie e gli Istituti nazionali di sanità consigliano di manipolare i potenziali agenti infettivi a livello di biosicurezza 2.
- La maggior parte delle soluzioni in kit contengono ProClin 300 come conservante. Non pipettare per bocca né consentire il contatto di reagenti o campioni di pazienti con la pelle. I reagenti contenenti ProClin 300 possono essere irritanti. Evitare il contatto con pelle e occhi. In caso di contatto, risciacquare con abbondante acqua.
- La soluzione di arresto contiene acido solforico 0,5 M. Non consentire il contatto del reagente con la pelle.
- Le concentrazioni di cromogranina A in un determinato campione con dosaggi di diversi produttori possono variare in base alle differenze nei metodi di dosaggio e nella specificità dei reagenti.
- I rifiuti devono essere trattati come pericolosi.
- Le schede dei dati di sicurezza per tutti i componenti pericolosi contenuti in questo kit sono disponibili a richiesta presso Dako Denmark A/S.

Attenzione

CAL	X	LYO
DIL		
CONJ	100X	

CONTROL	L	LYO
CONTROL	H	LYO

Contiene ProClin 300:
Miscela di: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317:	Può provocare una reazione allergica cutanea.
P264:	Lavare accuratamente le mani dopo l'uso.
P280:	Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
P302+352:	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone.
P333+313:	In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.

RACCOLTA DEI CAMPIONI

La CgAnalyze Kit è consigliata per il siero/EDTA/plasma eparinico.
Manipolare come potenziale trasmettitore di agenti infettivi.
I campioni vengono separati per centrifugazione e possono essere conservati fino a 7 giorni a 2-8 °C. Se devono essere conservati per periodi più lunghi, mantenere i campioni a -20°C o a temperature inferiori. I campioni possono essere sottoposti a 3 cicli di congelamento/scongelamento senza deteriorarsi.
Non utilizzare un congelatore anti-sbrinamento in quanto i campioni potrebbero essere sottoposti a cicli di congelamento/scongelamento con conseguente degrado degli anticorpi. I campioni non correttamente conservati o soggetti a più cicli di congelamento/scongelamento possono provocare risultati spuri.

COMPONENTI DEL KIT E CONSERVAZIONE DEI REAGENTI
- Un telaio con 96 pozzetti, sigillate in una busta dry-pack di alluminio.
- Sei flaconi con calibratori contenenti cromogranina A umana in diluente. CAL 1 = 0 ng/mL (diluente), CAL 2 = 36 ng/mL, CAL 3 = 180 ng/mL, CAL 4 = 540 ng/mL, CAL 5 = 1080 ng/mL, CAL 6 = 1800 ng/mL.
- Un flacone con controllo basso liofilizzato (L), colore verde.
- Un flacone con controllo alto liofilizzato (H), colore rosso.
- 30 mL di diluente (DIL) contenente anticorpi marcati biotina con cromogranina A., di colore rosso. Pronto all'uso.
- 150 µL di coniugato (CONJ) contenente anticorpi marcati HRP con cromogranina A. Concentrazione 100x.
- 15 mL di tampone di coniugato (di colore blu). Pronto all'uso.
- 15 mL di substrato TMB. Pronto all'uso.
- 15 mL di soluzione di arresto (0,5M H_2SO_4) Pronto all'uso.
- 2 x 35 mL di soluzione di lavaggio concentrata 20x.

Prima dell'uso
I controlli e i calibratori liofilizzati dovranno essere sciolti con cautela in 300 µL di acqua distillata. Dopo l'uso, i controlli e i calibratori ricostituiti saranno conservati a -20 °C o a temperature inferiori. I controlli e i calibratori possono essere sottoposti a 3 cicli di congelamento/scongelamento senza deteriorarsi.
Gli altri reagenti del kit dovranno essere conservati a 2-8 °C.
I controlli e i calibratori ricostituiti dovranno essere diluiti 5x in diluente a ogni test.
La quantità di coniugato necessaria per ogni analisi dovrà essere diluita 100x prima dell'uso (10uL di coniugato + 990 uL di tampone di coniugato per striscia).
Il coniugato diluito residuo dovrà essere gettato. La soluzione di lavaggio dovrà essere diluita 20x prima dell'uso. Diluire 10 mL di soluzione di lavaggio concentrata 20x in 190 ml di acqua distillata. Se conservata a 2-8 °C, la soluzione di lavaggio diluita è stabile fino alla data di scadenza indicata sul kit.
Il residuo di reagenti nel kit è pronto all'uso.
Estrarre soltanto il numero di pozzetti necessario al test, risigillando con cura la confezione di alluminio.

Materiali o attrezzature richieste ma non fornite
- Lettore per micropiastra con filtro 450 nm. Lunghezza d'onda di riferimento 620 nm.
- Piastra di diluizione 300 µL/pozzetto per diluizione di calibratore, campioni del paziente e controlli.
- Pipette di precisione con puntali monouso.
- Lavatore automatico di piastre per microtitolazione, tessuto assorbente, provette e timer.

PROCEDURA
Tutte le soluzioni devono essere utilizzate a temperatura ambiente. Incubare in tutte le fasi a temperatura ambiente (20-30 °C).

Diluizione e incubazione dei campioni
Diluire i campioni 5x in una piastra di diluizione separata prima del passaggio alla piastra di prova. Diluire calibratori, controllo basso, controllo alto e plasma del paziente in 50 µL di plasma + 200 µL di diluente. Miscelare con cura pipettando verso l'alto e verso il basso prima di trasferire 100µL in duplicato alla piastra di prova seguendo la tabella riportata sotto.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CAL1	CAL5	P1									
B	CAL1	CAL5	P1									
C	CAL2	CAL6	P2									
D	CAL2	CAL 6	P2									
E	CAL3	H	ecc									
F	CAL3	H										
G	CAL4	L										
H	CAL4	L										

Incubare per 60 minuti.

Dopo l'incubazione dei campioni
Lavare tre (3) volte con soluzione di lavaggio 300 µL/pozzetto, riempiendo e svuotando ogni volta i pozzetti. Dopo l'ultimo lavaggio, svuotare i pozzetti picchiettando la piastra su un tessuto assorbente.

Aggiunta del coniugato
Aggiungere 100 µL di coniugato in ciascun pozzetto.
Incubare per 30 minuti.

Dopo l'incubazione del coniugato
Lavare come sopra.

Aggiunta della soluzione di substrato
Aggiungere 100 µL di substrato TMB in ciascun pozzetto, incubare al buio per 15 minuti. Il tempo di incubazione può essere ridotto a 10 minuti se la DO massima supera il 3.0 ad alte temperature o in caso di utilizzo di un metodo automatizzato.

Aggiunta della soluzione di arresto
Aggiungere 100 µL di soluzione di arresto in ciascun pozzetto. Leggere l'assorbanza a 450 nm in 2 ore su un lettore per micropiastra. Leggere a 620 nm come lunghezza d'onda di riferimento.

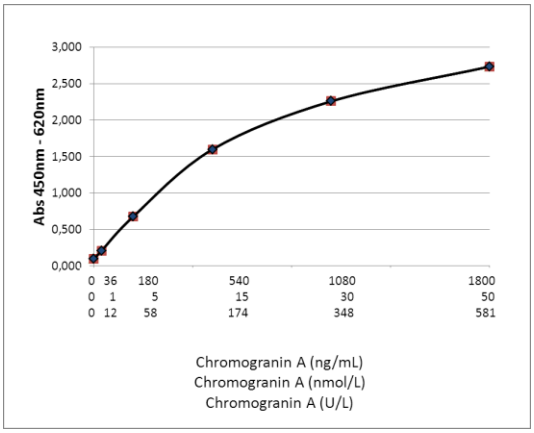
Calcoli
Costruire una curva del calibratore tracciando le DO rispetto ai valori ng/mL dei sei calibratori. I sei calibratori forniti hanno rispettivamente valori pari a 0 ng/mL per il calibratore 1, 36 ng/mL per il calibratore 2, 180 ng/mL per il calibratore 3, 540 ng/mL per il calibratore 4, 1080 ng/mL per il calibratore 5, 1800 ng/mL per il calibratore 6. Leggere i valori dei comandi alti e bassi e i campioni del paziente dalla curva. I valori superiori al valore massimo del calibratore dovranno essere registrati come >1800 ng/mL o ulteriormente diluiti con diluente e ridosati. In questo caso, il diluente deve essere compensato nel calcolo della concentrazione di cromogranina A.

Si osservi che qualora il calibratore 1 o il calibratore 6 risulti fuori dai limiti, il test essere considerato nullo e quindi ripetuto.

Per praticità le concentrazioni possono essere calcolate in ng/ml, nmol/l o U/L. Tutto le unità sono riportate nella tabella qui di seguito. Per la conversione è stato utilizzato il peso molecolare del frammento originale di cromogranina A (36kDa) (Stridsberg, M et al. 1993, Stridsberg et al. 1995)

Esempio

Calibratore	Concentrazione			Assorbanza
	ng/ml	nmol/l	U/L	
1	0	0	0	0,094
2	36	1	12	0,209
3	180	5	58	0,678
4	540	15	174	1,599
5	1080	30	348	2,259
6	1800	50	581	2,735



Un campione con un valore di assorbanza di 1,272 sarà letto sull'asse X come avente 367 ng/mL (o 10,2 nmol/L, o 118 U/L) di cromogranina A. In quest'esempio è stato applicato uno schema con curva logistica a 4 parametri.
Importante: la curva è illustrata a titolo esemplificativo e non deve essere usata per la reale interpretazione dei campioni del paziente.

Controllo qualità
La DO per il calibratore 1 deve essere < 0,15.
La DO per il calibratore 6 deve essere > 1,0.
Per i valori dei comandi alti e bassi, vedere la certificazione del lotto.
Scopo dei controlli è monitorare il danno sostanziale del reagente. Se un valore qualsiasi dei controlli non si trova nei rispettivi limiti, il test deve essere considerato nullo e quindi ripetuto. I controlli supplementari si possono testare secondo le linee guida o i requisiti delle disposizioni locali, statali e/o federali o di organismi accreditanti. Per le linee guida sulle corrette pratiche di CQ, fare riferimento a NCCLS C24-A.

Effetto gancio
Non è stato riscontrato alcun effetto gancio durante i test su concentrazione di cromogranina A fino a 360 000 ng/mL (o 10 000 nmol/L, o 116 000 U/L).

LIMITAZIONI
Il solo livello di cromogranina A del singolo paziente non può essere utilizzato per valutare la gravità della malattia. Il test non deve essere considerato l'unico fondamento per prendere decisioni sulla terapia clinica, ma usato in combinazione con i sintomi clinici e i risultati di altri test disponibili.

Interferenza
Non è stata rilevata alcuna interferenza quando i campioni di plasma sono stati combinati con bilirubina F (208 mg/l), bilirubina C (200 mg/l), emoglobina emolitica (4,84 g/l) o chilo (1430 FTU).
I pazienti che ricevono anticorpi antiumani a scopo di trattamento o diagnosi oppure i pazienti altrimenti esposti a immunoglobulina del topo possono produrre anticorpi umani antitopo (HAMA), che possono interferire con i dosaggi quando si utilizzano anticorpi monoclonali del topo e provocare falsi livelli elevati.

Risultati attesi
È consigliabile che ogni laboratorio stabilisca i limiti di riferimento con i campioni comunemente usati in quanto le variazioni nella manipolazione dei campioni stessi possono compromettere i risultati. Seguire una procedura di movimentazione dei campioni rigorosa come riportato sopra. I valori di seguito riportati sono indicativi dei limiti di riferimento attesi e calcolati come 97,5 percentile di 126 campioni di donatori di sangue di plasma eparinico (63 uomini e 63 donne).

Livello di cromogranina nei limiti di riferimento: ≤ 108 ng/mL (o 3.0 nmol/L, o 35 U/L).

Limite di rilevazione
Il limite di rilevazione del dosaggio è pari a 19 ng/mL (o 0.54 nmol/L, o 6 U/L). Si tratta della concentrazione minima rilevabile diversa da zero con una probabilità del 95%. Ciò significa che si possono effettuare misurazioni affidabili persino su campioni negativi fino a questo punto. Il calcolo è stato eseguito secondo le linee guida NCCLS EP17-A vol. 24 n° 34.

Incrementi di cromogranina A non associati a tumore
L'incremento dei valori di cromogranina A si può riscontrare in pazienti con funzionalità renale ridotta, con gastrite atrofica e sottoposti a trattamento con farmaci inibitori di pompa protonica.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Tabella 1. Sensibilità e specificità clinica.

Sensibilità clinica
Sono stati dosati in totale 107 campioni di plasma eparinico con caratterizzazione clinica. I risultati sono riportati, in sintesi, nella tabella seguente.

Gruppi di malattie	Numero totale	Positivo >3.0 nmol/L	Negativo ≤ 3.0 nmol/L	Sensibilità %
ECL	4	3	1	75
EPT	30	19	11	63
FGC	10	7	3	70
LC	9	4	5	44
MGC	47	28	19	60
NE Diff	6	2	4	33
Paraganglioma	1	1	0	100

ECL = Tumori tipo enterocromaffina
EPT = Tumore endocrino del pancreas
FGC = Carcinoide del foregut
LC = Carcinoide del polmone
MGC = Carcinoide del midgut
NE Diff = Differenziazione neurocrina

Specificità
Sono stati dosati 126 campioni di plasma eparinico di donatori di sangue apparentemente sani, 126 campioni sono risultati negativi:

126/126 = 100 % 95% CI = 97,1 - 100%

L'intervallo di confidenza (CI) del 95% è stato calcolato con il metodo esatto.

Tabella 2. La precisione interdosaggio è stata determinata da test su sei diversi campioni in otto replicati in tre diversi casi.

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Valore medio (ng/mL)	150	209	316	486	838	1212
SD	14,0	10,8	28,3	41,7	80,6	69,8
% CV	9	5	9	9	10	6

Tabella 3. La precisione intradosaggio è stata determinata da test su sei diversi campioni in otto replicati in tre diversi casi.

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Valore medio (ng/mL)	156	214	335	502	868	1255
SD	6,4	11,3	10,4	23,3	42,8	101,4
% CV	4	5	3	5	5	8

Tabella 4. La variazione tra lotti è stata determinata da test su sei diversi campioni in otto replicati in tre diversi casi.

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Valore medio (ng/mL)	145	205	309	459	794	1165
SD	9,6	7,8	22,9	38,5	69,2	78,1
% CV	7	4	7	8	9	7

Tabella 5. Il recupero di diluizione è stato calcolato testando cinque diluizioni seriali di tre campioni diversi.

Campione	**Diluizione**	**Concentrazione misurata media (ng/ml)**	**Concentrazione calcolata (ng/ml)**	**% di recupero di diluizione corretta**
1	1/5	1540	1540	100
	1/10	756	770	98
	1/20	366	385	95
	1/40	179	193	93
	1/80	90	96	94
Campione	**Diluizione**	**Concentrazione misurata media (ng/ml)**	**Concentrazione calcolata (ng/ml)**	**% di recupero di diluizione corretta**
2	1/5	1134	1134	100
	1/10	587	567	104
	1/20	278	283	98
	1/40	139	142	98
	1/80	72	71	101
Campione	**Diluizione**	**Concentrazione misurata media (ng/ml)**	**Concentrazione calcolata (ng/ml)**	**% di recupero di diluizione corretta**
3	1/5	1293	1293	100
	1/10	625	646	97
	1/20	292	323	90
	1/40	144	162	89
	1/80	76	81	94

RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Problema	Possibili cause	Azione correttiva
Uno o più calibratori fuori limiti.	1. Mancata aggiunta di uno o più reagenti oppure aggiunta nella sequenza errata. 2. Pipettamento non corretto.	1. Test nullo. Ripetere il test. 2. Test nullo. Ripetere il test.
Valori di controllo fuori limiti.	1. Temperatura, tempistica o pipettamento non corretto; reagenti non miscelati. 2. Contaminazione incrociata dei controlli. 3. Diluizione non corretta. 4. Percorso ottico non pulito.	1. Controllare che tempo e temperatura siano corretti. Vedere “Scarsa precisione” sotto. Ripetere il test. 2. Pipettare attentamente. 3. Ripetere il test. 4. Controllare la presenza di sporcizia o bolle d’aria nei pozzetti. Pulire il fondo e ripetere la lettura.
Risultati dei test vuoti.	1. Mancata aggiunta di uno o più reagenti oppure aggiunta nella sequenza errata. 2. Piastra rivestita inattiva.	1. Ricontrollare la procedura. Controllare il reagente inutilizzato. Ripetere il test. 2. Controllare l’umidità evidente nei pozzetti inutilizzati. Pulire il fondo e ripetere la lettura.
Risultati dei test gialli.	1. Tamponi o reagenti contaminati. 2. Contaminazione della soluzione di lavaggio 3. Diluizione del siero non corretta.	1. Controllare la torbidità o l’odore sgradevole delle soluzioni. 2. Utilizzare un contenitore pulito. Controllare la qualità della soluzione in acqua utilizzata per la preparazione. 3. Ripetere il test.
Il massimo DO risulta elevato (supera 3,0)	1. Temperature di incubazione troppo alte/utilizzo del metodo automatizzato.	1. Ridurre il tempo di incubazione per il substrato.
Scarsa precisione.	1. CV fornitura pipetta maggiore del 5%. 2. Campioni o reagenti non sufficientemente miscelati o non bilanciati a temperatura ambiente. 3. Durata eccessiva dell’aggiunta di reagenti; intervalli di tempo non coerenti. 4. Percorso ottico non pulito. 5. Lavaggio non coerente; bolle intrappolate; soluzione di lavaggio residua nei pozzetti.	1. Controllare la taratura della pipetta. Utilizzare una tecnica riproducibile. 2. Miscelare i reagenti con cautela, ma accuratamente e bilanciare la temperatura ambiente. 3. Sviluppare una tecnica uniforme coerente e utilizzare un dispositivo a più puntali o un distributore automatico per ridurre il tempo. 4. Controllare la presenza di bolle d’aria nei pozzetti. Pulire il fondo della piastra e ripetere la lettura. 5. Controllare che i pozzetti vengano riempiti e aspirati in modo uniforme. Distribuire il liquido sopra il livello di reagenti nel pozzetto. Dopo l’ultimo lavaggio, svuotare i pozzetti picchiettando la striscia su un tessuto assorbente.

	6. Pipettamento non corretto.	6. Evitare le bolle d'aria nei puntali delle pipette.

RIFERIMENTI

1. Bajetta, E., Ferrari, L., Martinetti, A., Celio, L., Procopio, G., Artale, S., Zilembo, N., Di Bartolomeo, M., Seregni, E. and Bombardieri, E.
Chromogranin A, neuron specific enolase, carcinoembryonic antigen, and hydroxyindole acetic acid evaluation in patient with neuroendocrine tumours.
Cancer 1999, **86:**858-865.

2. Eriksson, B., Öberg, K. and Stridsberg, M.
Tumour markers in neuroendocrine tumours.
Digestion 2000, **62:**33-38.

3. O'Connor, D.T. and Deftos, L.J.
Secretion of chromogranin A by peptide-producing endocrine neoplasms.
New England Journal of Medicine 1986, **314:**1145-1151.

4. Stridsberg, M., Hellman, U., Wilander, E., Lundqvist, G., Hellsing, K. and Öberg, K.
Fragments of chromogranin A are present in the urine of patients with carcinoid tumours: Development of a specific radioimmunoassay for chromogranin A and its fragments.
Journal of Endocrinology 1993, **139:**329-337.

5. Stridsberg, M., Öberg, K., Li, Q., Engström, U. and Lundqvist, G.
Measurements of chromogranin A, chromogranin B (secretogranin I), chromogranin C (secretogranin II) and pancreastatin in plasma and urine from patients with carcinoid tumours and endocrine pancreatic tumours.
Journal of Endocrinology 1995, **144:**49-59.

6. Stridsberg, M.
Measurements of chromogranins and chromogranin-related peptides by immunological methods.
Advanced Experimental and Medical Biology 2000, **482:**319-327.

7. Winkler, H. and Fischer-Colbrie, R.
The chromogranin A and B: The first 25 years and future perspectives.
Neuroscience 1992, **49:**497-528.

LA SPIEGAZIONE DI SIMBOLI

Ag	Antigene (pozzetti sensibilizzati).
DIL	Diluente.
BUF **CONJ**	Tampone di coniugato.
CONJ **100X**	HRP coniugato conc. 100x.
BUF **WASH** **20X**	Tampone di lavaggio concentrato 20x.
SUBS **TMB**	Cromogeno (TMB) / Substrato.
H_2SO_4 **0.5M**	Soluzione di stop (soluzione di acido solforico).
CAL **X** **LYO**	Calibratore liofilizzato.
CONTROL **L** **LYO**	Controllo basso liofilizzato.
CONTROL **H** **LYO**	Controllo alto liofilizzato.

	Lotto No.
	Numero di catalogo.
	Utilizzare entro.
	Limiti di temperatura.
	Rischio biologico.
	Leggere le istruzioni per l'uso.
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro.
	Produttore.
	Attenzione.
	Contenuto sufficiente per 96 test.
	Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.

CgAnalyze Kit
ČESKY

POUŽITÍ V SOULADU S URČENÍM
Souprava CgAnalyze je heterogenní enzymová imunoanalýza (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), která slouží k detekci a kvantitativnímu stanovení chromograninu A v lidské plazmě nebo séru. Výsledky tohoto stanovení lze použít jako pomůcku při určování diagnózy neuroendokrinních tumorů (NET) secernujících chromogranin A, jako jsou feochromocytomy a karcinoidy. Tento test je určen pro pacienty se známkami a příznaky svědčícími pro přítomnost NET. Není určen ke screeningovému vyšetřování zdravé populace.
Analýzu by měli provádět vyškolení laboratorní pracovníci.

PRO DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ IN VITRO.

SOUHRN A VYSVĚTLENÍ
Chromograniny a sekretograniny jsou skupinou jedinečných kyselých proteinů, které jsou ukládány spolu s neurotransmitery a peptidovými hormony v mozku a difuzním neuroendokrinním systému (Winkler, H. & Fischer-Colbrie, R.1992). Strukturálně jsou tyto proteiny produkty odlišných genů, mají však společné některé obecné vlastnosti, jako je například vysoký podíl kyselých aminokyselinových zbytků a několik párů zásaditých aminokyselin, které se nalézají na pozicích vhodných pro potenciální posttranslační štěpení. Chromograniny jsou ukládány a uvolňovány společně s neuropeptidy a hormony v neuroendokrinních buňkách nalézajících se po celém těle. Úkolem chromograninů je patrně vytváření granulí obsahujících hormony a kombinace hormonů. Chromograniny lze dále štěpit na menší fragmenty, které mají biologické účinky, jako je inhibice uvolňování hormonů, vasodilatace a antimikrobiologické účinky (Stridsberg M, 2000).

Tumory neuroendokrinního původu se zpravidla vyznačují zvýšenými hladinami chromograninu A v séru/plazmě (O'Connor, DT, Deftos LJ, 1986). Neuroendokrinní tumory jsou odvozeny od neuroendokrinních buněk; typické neuroendokrinní tumory jsou karcinoidní tumory, feochromocytomy, neuroblastomy, malobuněčné karcinomy plic, adenomy příštítných tělísek, tumory podvěsku mozkového a tumory Langerhansových ostrůvků pankreatu, včetně syndromů MEN1 a MEN2. Patří mezi ně rovněž různé syndromy způsobené neuroendokrinními tumory, konkrétně gastrinomy, inzulinomy, glukagonomy, somatostatinomy, PPomy a nefunkčními neuroendokrinními tumory (Eriksson, B. a kol. 2000). U těchto tumorů bylo prokázáno, že chromogranin A je nejlepším markerem v krevním oběhu (Bajetta, E. a kol. 1999).

Princip soupravy CgAnalyze
Na samostatné ředicí destičce se ředicím roztokem 5x zředí vzorky pacientů, kalibrátory a kontroly. Zředěný materiál se přenese do mikrotitračních jamek a inkubuje po dobu 60 minut při laboratorní teplotě. Během této první inkubace se chromogranin A naváže na monoklonální protilátku na povrchu jamky. Po promytí, kterým se odstraní nenavázaný materiál, se přidá druhá monoklonální protilátka, značená křenovou peroxidázou (HRP), která slouží k detekci chromograninu A navázaného na jamku. Po 30minutové inkubaci se jamky znovu promyjí, přidá se barevný substrát a inkubuje se. Vývoj zbarvení se zastaví za 15 minut a zbarvení se změří pomocí spektrofotometru. Zbarvení je přímo úměrné množství chromograninu A navázaného na jamku. Množství chromograninu se stanoví porovnáním vzniklého zbarvení se vzorky kalibrátorů.

Kalibrátor obsažený v soupravě je syntetický peptid, který odpovídá chromograninu A. Peptidový kalibrátor je vytvořen tak, aby způsoboval stejnou odpověď jako purifikovaný nativní fragment chromograninu A (Stridsberg, M a kol. 1993, Stridsberg a kol. 1995)

VAROVÁNÍ A UPOZORNĚNÍ

- Pro diagnostické použití in vitro.
- Testovací reagencie neobsahují žádné součásti lidského séra, s analyzovanými vzorky plazmy pacientů je však nutno zacházet opatrně, protože mohou přenášet infekční agens.
- Americká střediska pro kontrolu a prevenci nemocí (Centers for Disease Control and Prevention) a národní zdravotní ústavy (National Institutes of Health) doporučují, aby se s potenciálně infekčními látkami zacházelo podle zásad biologické bezpečnosti úrovně 2.
- Většina roztoků v soupravě obsahuje jako konzervační látku ProClin 300. Nikdy nepipetujte ústy ani nedovolte, aby reagencie nebo vzorky pacientů přišly do styku s kůží. Reagencie obsahující ProClin 300 mohou působit dráždivě. Zabraňte kontaktu s kůží a očima. Při případném kontaktu omyjte zasažené místo velkým množstvím vody.
- Zastavovací roztok obsahuje 0,5M kyselinu sírovou. Zabraňte kontaktu této reagencie s kůží.
- Koncentrace chromograninu A v příslušném vzorku stanovená pomocí testů různých výrobců se může lišit vzhledem k rozdílům v testovacích metodách a specificitě reagencií.
- S veškerým odpadem je nutno zacházet jako s nebezpečným odpadem.
- Bezpečnostní listy ke všem nebezpečným složkám obsaženým v této soupravě na požádání poskytne společnost Dako Denmark A/S.

CAL	X	LYO
DIL		
CONJ	100X	

CONTROL	L	LYO
CONTROL	H	LYO

Varování

Obsahuje ProClin 300:
Reakční směs se složkami: 5-chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on [číslo EC 247-500-7] a 2-methyl-4-isothiazolin-3-on [číslo EC 220-239-6] (3:1)

H317:	Může vyvolat alergickou kožní reakci.
P264:	Po manipulaci důkladně omyjte ruce.
P280:	Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.
P302+352:	PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody a mýdla.
P333+313:	Při podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

ODBĚR VZORKŮ

Pro soupravu CgAnalyze Kit se doporučuje použít sérum či plasmu s EDTA nebo heparinem. Se vzorky zacházejte jako s potenciálně infekčním materiálem.
Vzorky se separují odstředěním a lze je skladovat při teplotě 2–8 °C po dobu nejvýše 7 dní. Delší skladování vzorků je možné při teplotách -20 °C nebo nižších. Vzorky mohou být třikrát zmrazeny a rozmrazeny, aniž by došlo ke zhoršení jejich kvality.
Nepoužívejte mrazničku typu frost-free, protože v té by mohly vzorky opakovaně procházet zmrazením a rozmrazením a mohlo by dojít k rozkladu protilátek. Výsledky stanovení při použití nesprávně skladovaných vzorků nebo vzorků, které byly vícekrát zmrazeny a rozmrazeny, mohou být sporné.

SOUČÁSTI SOUPRAVY A SKLADOVÁNÍ REAGENCIÍ

- Jedna destička s 96 jamkami, zatavená ve fólii a v suchém balení.
- Šest lahviček s lyofilizovanými kalibrátory, obsahujících lidský chromogranin A v ředicím roztoku. CAL 1 = 0 ng/mL (ředicí roztok), CAL 2 = 36 ng/mL, CAL 3 = 180 ng/mL, CAL 4 = 540 ng/mL, CAL 5 = 1080 ng/mL, CAL 6 = 1800 ng/mL.
- Jedna lahvička s lyofilizovanou kontrolou s nízkou koncentrací analytu (Low control, L), zelená barva.

- Jedna lahvička s lyofilizovanou kontrolou s vysokou koncentrací analytu (High control, H), červená barva.
- 30 mL ředicí roztok (Diluent, DIL), obsahující protilátky proti chromograninu A značené biotinem, červená barva. Připraveno k okamžitému použití:
- 150 µL konjugát (Conjugate, CONJ), obsahující protilátky proti chromograninu A značené HRP. 100x koncentrované.
- 15 mL konjugátový pufr (Conjugate buffer) (modrá barva). Připraveno k okamžitému použití:
- 15 mL substrát TMB. Připraveno k okamžitému použití:
- 15 mL zastavovací roztok (0,5M H_2SO_4). Připraveno k okamžitému použití:
- 2 x 35 mL promývací roztok, 20x koncentrovaný.

Před použitím
Lyofilizované kalibrátory a kontroly se opatrně rozpustí ve 300 µL destilované vody. Po použití je třeba rekonstituované kalibrátory a kontroly skladovat při teplotě -20 °C nebo nižší. Kalibrátory a kontroly mohou být třikrát zmrazeny a rozmrazeny, aniž by došlo ke zhoršení jejich kvality.
Ostatní reagencie v soupravě je třeba skladovat při teplotě 2–8 °C.
Při každém provedení testu je třeba rekonstituované kalibrátory a kontroly 5x zředit ředicím roztokem.
Množství konjugátu potřebné pro každou analýzu je třeba před použitím 100x zředit (10 µL konjugátu + 990 µL konjugátového pufru na jeden strip). Zbývající zředěný konjugát je třeba zlikvidovat.
Promývací roztok je třeba před použitím 20x zředit. Zřeďte 10 mL 20x koncentrovaného promývacího roztoku 190 mL destilované vody. Při uchovávání při teplotě 2–8 °C je zředěný promývací roztok stabilní až do data exspirace soupravy.
Zbytek reagencií v soupravě je připraven k okamžitému použití.
Oddělte přesný počet jamek, které potřebujete pro test, a znovu pečlivě uzavřete aluminiové balení.

Vyžadované materiály nebo vybavení, které nejsou součástí balení
- Čtečka mikrodesiček s filtrem s vlnovou délkou 450 nm. Referenční vlnová délka je 620 nm.
- Ředicí destička s jamkami o objemu 300 µL pro ředění kalibrátoru, pacientské vzorky a kontroly.
- Přesné pipety s jednorázovými špičkami.
- Automatická promývací jednotka pro mikrotitrační destičky, absorpční materiál, zkumavky a časovač.

POSTUP
Všechny roztoky je nutno používat při laboratorní teplotě. Všechny kroky zahrnující inkubaci provádějte při laboratorní teplotě (20–30 °C).

Ředění a inkubace vzorků
Zřeďte všechny vzorky 5x na samostatné ředicí destičce a poté je přeneste na testovací destičku. Kalibrátory, kontrola s nízkou koncentrací analytu, kontrola s vysokou koncentrací analytu a pacientova plazma se zředí 50 µL plazmy + 200 µL ředicího roztoku. Důkladně promíchejte nasátím do pipety a vypuštěním před duplicitním přenesením 100 µL na testovací destičku podle níže uvedeného schématu.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CAL 1	CAL 5	P1									
B	CAL 1	CAL 5	P1									
C	CAL 2	CAL 6	P2									
D	CAL 2	CAL 6	P2									
E	CAL 3	H	atd.									
F	CAL 3	H										
G	CAL 4	L										
H	CAL 4	L										

Inkubujte po dobu 60 minut.

Po inkubaci vzorku
Vzorky třikrát (3) promyjte 300 µL promývacího roztoku na jednu jamku; jamky vždy naplňte a vyprázdněte. Po posledním promytí jamky vyprázdněte a vyklepejte mikrotitrační destičku o absorpční materiál.

Přidání konjugátu
Do každé jamky přidejte 100 µL konjugátu.
Inkubujte po dobu 30 minut.

Po inkubaci konjugátu
Promyjte stejně jako po předchozím kroku.

Přidání roztoku substrátu
Přidejte 100 µL substrátu TMB do každé jamky a inkubujte v temnu po dobu 15 minut. Inkubační dobu lze zkrátit na 10 minut, pokud maximální optická denzita (OD) překročí hodnotu 3,0 při vysokých teplotách, nebo při použití automatizované metody.

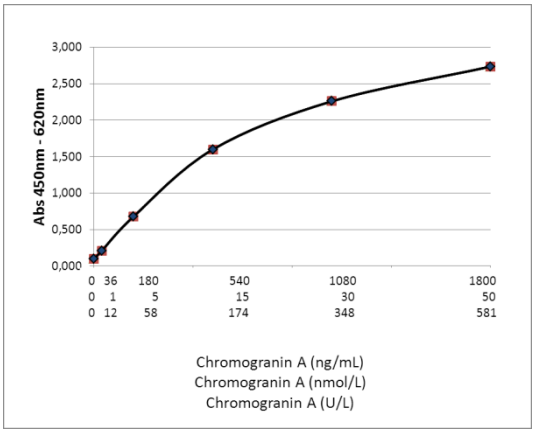
Přidání zastavovacího roztoku
Do každé jamky přidejte 100 µL zastavovacího roztoku. Za 2 hodiny odečtěte absorbanci při vlnové délce 450 nm na čtečce mikrodestiček. Odečtěte absorbanci při vlnové délce 620 nm (referenční vlnová délka).

Výpočty
Sestrojte kalibrační křivku vynesením optické denzity proti hodnotám ng/mL pro šest kalibrátorů. Hodnoty pro dodaných šest kalibrátorů jsou 0 ng/mL pro kalibrátor 1, 36 ng/mL pro kalibrátor 2, 180 ng/mL pro kalibrátor 3, 540 ng/mL pro kalibrátor 4, 1080 ng/mL pro kalibrátor 5, 1800 ng/mL pro kalibrátor 6. Odečtěte z křivky hodnoty pro kontrolu s nízkou a s vysokou hodnotou koncentrace analytu a vzorky pacientů.

Hodnoty vyšší než nejvyšší hodnoty kalibrátoru by měly být uváděny jako >1800 ng/mL, nebo by takové vzorky měly být dále naředěny a znovu analyzovány. V takovém případě je třeba při výpočtu koncentrace chromograninu A kompenzovat ředění.
Pamatujte: pokud jsou hodnoty kalibrátoru 1 nebo kalibrátoru 6 mimo rozsah, test by měl být prohlášen za neplatný a zopakován.

Jako jednotku pro výpočet koncentrace lze zvolit ng/mL, nmol/L nebo U/L. Jednotky jsou uvedeny v tabulce níže. Pro přepočítání byla použita molekulová hmotnost nativního fragmentu chromograninu A (36kDa) (Stridsberg, M a kol. 1993, Stridsberg a kol. 1995)

Kalibrátor	**Koncentrace**			**Absorbance**
	ng/mL	nmol/L	U/L	
1	0	0	0	0,094
2	36	1	12	0,209
3	180	5	58	0,678
4	540	15	174	1,599
5	1080	30	348	2,259
6	1800	50	581	2,735



Pro vzorek s hodnotou absorbance 1,272 bude na ose X odečtena koncentrace 367 ng/mL (nebo 10,2 nmol/L nebo 118 U/L) chromograninu A. V tomto příkladu byla použita čtyřparametrová logistická křivka.
Důležité: Tato křivka je pouze příkladem a nesmí být použita k interpretaci skutečných vzorků pacientů.

Kontrola kvality
OD pro kalibrátor 1 by měla být < 0,15.
OD pro kalibrátor 6 by měla být > 1,0.
Hodnoty pro kontrolu s nízkou a s vysokou hodnotou koncentrace analytu jsou uvedeny v certifikátu šarže.
Tyto kontroly slouží ke zjištění, zda nedošlo k významnému selhání reagencie. Pokud jakákoli hodnota některé z kontrol není v příslušném rozmezí, test je nutné považovat za neplatný a zopakovat. Podle pokynů nebo požadavků místních, státních a/nebo federálních předpisů či akreditačních organizací mohou být testovány i další kontroly. Pokyny k příslušným postupům kontroly kvality uvádí dokument NCCLS C24-A.

Účinek vysoké koncentrace (tzv. „Hook efekt“)
Při testování koncentrací chromograninu A do 360 000 ng/mL (nebo 10 000 nmol/L nebo 116 000 U/L) nebyl pozorován žádný účinek vysoké koncentrace („Hook efekt“).

OMEZENÍ
Samotná hladina chromograninu A nemůže být u jednotlivých pacientů používána jako měřítko závažnosti onemocnění. Na tento test nelze spoléhat jako na jediný podklad při rozhodování o klinické léčbě, ale musí být používán v kombinaci s údaji o klinických příznacích a výsledky jiných dostupných testů.

Interference
U vzorků plazmy s přídavkem bilirubinu F (208 mg/L), bilirubinu C (200 mg/L), hemolytického hemoglobinu (4,84 g/L) nebo chylu (1430 FTU) nebyla zjištěna žádná interference.
Pacienti, kterým byly z diagnostických či léčebných důvodů podány myší protilátky proti lidským protilátkám, nebo pacienti, kteří se setkali s myším imunoglobulinem jinak, mohou vytvářet lidské anti-myší protilátky (HAMA). Tyto protilátky mohou interferovat s testy používajícími myší monoklonální protilátky a mohou vést ke stanovení falešně zvýšených hladin.

Očekávané výsledky
Doporučuje se, aby si každá laboratoř stanovila vlastní referenční rozsah za použití běžných vzorků, protože odchylky při zpracování vzorků mohou ovlivnit výsledky. Je nutné přesně dodržovat postup manipulace se vzorky, který je doporučen výše. Níže uvedené hodnoty představují očekávaný referenční rozsah a byly vypočítány jako 97,5. percentil ze 126 vzorků heparinové plazmy od dárců krve (63 mužů a 63 žen).

Referenční rozsah hladiny chromograninu A v heparinové plazmě: $\leq$ 108 ng/mL (nebo 3,0 nmol/L nebo 35 U/L).

Mez detekce
Mez detekce tohoto testu je 19 ng/mL (nebo 0,54 nmol/L nebo 6 U/L). Jedná se o nejnižší detekovatelnou koncentraci, která se s 95% pravděpodobností bude lišit od nuly. Znamená, že až po tuto hodnotu jsou měření spolehlivá, a to i pro negativní vzorky. Výpočet byl prováděn podle pokynů NCCLS v dokumentu EP17-A, svazek 24, číslo 34.

Zvýšení hladin chromograninu A bez souvislosti s tumory
Zvýšené hladiny chromograninu A lze zjistit u pacientů se sníženou funkcí ledvin, pacientů s atrofickou gastritidou a pacientů podstupujících léčbu inhibitory protonové pumpy.

FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY

Tabulka 1. Klinická senzitivita a specificita.

Klinická senzitivita
Celkem bylo analyzováno 107 klinicky charakterizovaných vzorků heparinové plazmy. Následující tabulka je shrnutím výsledků.

Skupina onemocnění	Celkový počet	Pozitivní >3,0 nmol/L	Negativní ≤ 3,0 nmol/L	Senzitivita %
ECL	4	3	1	75
EPT	30	19	11	63
FGC	10	7	3	70
LC	9	4	5	44
MGC	47	28	19	60
NE Diff	6	2	4	33
Paragangliom	1	1	0	100

ECL = Enterochromafinní tumory
EPT = Endokrinní tumor pankreatu
FGC = Karcinoid horní části trávicí trubice
LC = Karcinoid plic
MGC = Karcinoid střední části střeva
NE Diff = Neurokrinní diferenciace

Specificita
Bylo testováno 126 vzorků plazmy s heparinem od zjevně zdravých dárců krve; těchto 126 vzorků bylo negativních:

126/126 = 100 % 95% CI = 97,1 %-100 %

95% interval spolehlivosti (CI) byl vypočten přesnou metodou.

Tabulka 2. Přesnost mezi testy byla stanovena testováním šesti odlišných vzorků v osmi replikátech při třech samostatných příležitostech.

	1	2	3	4	5	6
Střední hodnota (ng/mL) SD % CV	150 14,0 9	209 10,8 5	316 28,3 9	486 41,7 9	838 80,6 10	1212 69,8 6

Tabulka 3. Přesnost v rámci testu byla stanovena testováním šesti odlišných vzorků v osmi replikátech při jedné příležitosti.

	1	2	3	4	5	6
Střední hodnota (ng/mL) SD % CV	156 6,4 4	214 11,3 5	335 10,4 3	502 23,3 5	868 42,8 5	1255 101,4 8

Tabulka 4. Přesnost mezi dávkami byla stanovena testováním šesti odlišných vzorků v osmi replikátech při třech různých příležitostech.

	1	2	3	4	5	6
Střední hodnota (ng/mL) SD % CV	145 9,67	205 7,84	309 22,97	459 38,58	794 69,29	1165 78,17

Tabulka 5. Výtěžnost ve vztahu k ředění byla stanovena testováním pěti sériových ředění třech různých vzorků.

Vzorek	**Ředění**	**Střední naměřená koncentrace (ng/mL)**	**Vypočítaná koncentrace (ng/mL)**	**Korekce zohledňující ředění – % výtěžnosti**
1	1/5	1540	1540	100
	1/10	756	770	98
	1/20	366	385	95
	1/40	179	193	93
	1/80	90	96	94
Vzorek	**Ředění**	**Střední naměřená koncentrace (ng/mL)**	**Vypočítaná koncentrace (ng/mL)**	**Korekce zohledňující ředění – % výtěžnosti**
2	1/5	1134	1134	100
	1/10	587	567	104
	1/20	278	283	98
	1/40	139	142	98
	1/80	72	71	101
Vzorek	**Ředění**	**Střední naměřená koncentrace (ng/mL)**	**Vypočítaná koncentrace (ng/mL)**	**Korekce zohledňující ředění – % výtěžnosti**
3	1/5	1293	1293	100
	1/10	625	646	97
	1/20	292	323	90
	1/40	144	162	89
	1/80	76	81	94

ŘEŠENÍ POTÍŽÍ

Problém	Možné příčiny	Nápravná opatření
Jeden nebo více kalibrátorů je mimo rozsah.	1. Nebyla přidána nejméně jedna reagencie nebo chybné pořadí přidání.	1. Neplatný test. Opakujte test.
	2. Nesprávné pipetování.	2. Neplatný test. Opakujte test.
Kontrola má hodnotu mimo rozsah.	1. Nesprávná teplota, načasování nebo pipetování; reagencie nebyly promíchány.	1. Zkontrolujte, že čas a teplota byly správné. Viz „Nedostatečná přesnost“ níže. Opakujte test.
	2. Zkřížená kontaminace kontrol.	2. Pipetujte pečlivě.
	3. Nesprávné ředění.	3. Opakujte test.
	4. Optická dráha není čistá.	4. Zkontrolujte, zda v jamkách není přítomna nečistota nebo bublinky vzduchu. Otřete dno destičky a opakujte čtení.
Všechny testy mají prázdné výsledky.	1. Nebyla přidána nejméně jedna reagencie nebo chybné pořadí přidání.	1. Znovu zkontrolujte postup. Prověřte nepoužité reagencie. Opakujte test.
	2. Potažená destička není aktivní.	2. Zkontrolujte, zda v nepoužitých jamkách není vlhkost. Otřete dno destičky a opakujte čtení.
Všechny testy mají žluté výsledky.	1. Kontaminované pufry nebo reagencie.	1. Zkontrolujte všechny roztoky, zda není přítomen zákal nebo zápach.
	2. Kontaminovaný promývací roztok.	2. Použijte čistou nádobku. Zkontrolujte kvalitu vodného roztoku, použitého pro přípravu.
	3. Nesprávné naředění séra.	3. Opakujte test.
Maximální OD je zvýšena (vyšší než 3,0)	1. Příliš vysoké teploty inkubace/použití automatické metody.	1. Zkraťte dobu inkubace pro substrát.
Nedostatečná přesnost.	1. CV pipetování je vyšší než 5 %.	1. Zkontrolujte kalibraci pipety. Použijte reprodukovatelnou metodu.
	2. Vzorky nebo reagencie nebyly dostatečně promíchány nebo vytemperovány na laboratorní teplotu.	2. Všechny reagencie jemně, ale důkladně promíchejte a vytemperujte na laboratorní teplotu.
	3. Přidání reagencie příliš dlouho trvá; nekonzistentní intervaly časování.	3. Vytvořte konzistentní a uniformní techniku; ke zkrácení doby použijte zařízení s více špičkami nebo automatický dávkovač.
	4. Optická dráha není čistá.	4. Zkontrolujte, zda v jamkách nejsou bublinky vzduchu. Otřete dno destičky a opakujte čtení.

	5. Promývání není konsistentní; zachycené bublinky; v jamkách zbývá promývací roztok.	5. Zkontrolujte, že všechny jamky jsou naplněny a nasávání je stejnoměrné. Do všech jamek nadávkujte roztok do výše přesahující hladinu reagencie. Po posledním promytí jamky vyprázdněte a vyklepejte destičku o absorpční materiál.
	6. Nesprávné pipetování.	6. Zabraňte přítomnosti bublinek v pipetovací špičce.

LITERATURA

8. Bajetta, E., Ferrari, L., Martinetti, A., Celio, L., Procopio, G., Artale, S., Zilembo, N., Di Bartolomeo, M., Seregni, E. and Bombardieri, E.
Chromogranin A, neuron specific enolase, carcinoembryonic antigen, and hydroxyindole acetic acid evaluation in patient with neuroendocrine tumours.
*Cancer 1999, **86:**858-865.*

9. Eriksson, B., Öberg, K. and Stridsberg, M.
Tumour markers in neuroendocrine tumours.
*Digestion 2000, **62:**33-38.*

10. O'Connor, D.T. and Deftos, L.J.
Secretion of chromogranin A by peptide-producing endocrine neoplasms.
*New England Journal of Medicine 1986, **314:**1145-1151.*

11. Stridsberg, M., Hellman, U., Wilander, E., Lundqvist, G., Hellsing, K. and Öberg, K.
Fragments of chromogranin A are present in the urine of patients with carcinoid tumours: Development of a specific radioimmunoassay for chromogranin A and its fragments.
Journal of Endocrinology 1993, **139:**329-337.

12. Stridsberg, M., Öberg, K., Li, Q., Engström, U. and Lundqvist, G.
Measurements of chromogranin A, chromogranin B (secretogranin I), chromogranin C (secretogranin II) and pancreastatin in plasma and urine from patients with carcinoid tumours and endocrine pancreatic tumours.
*Journal of Endocrinology 1995, **144:**49-59.*

13. Stridsberg, M.
Measurements of chromogranins and chromogranin-related peptides by immunological methods.
*Advanced Experimental and Medical Biology 2000, **482:**319-327.*

14. Winkler, H. and Fischer-Colbrie, R.
The chromogranin A and B: The first 25 years and future perspectives.
*Neuroscience 1992, **49:**497-528.*

VYSVĚTLENÍ SYMBOLŮ

Ag	Antigen (potažená destička).
DIL	Ředicí roztok.
BUF **CONJ**	Konjugátový pufr.
CONJ **100X**	Konjugát s HRP 100x konc.
BUF **WASH** **20X**	Promývací pufr 20x koncentrovaný.
SUBS **TMB**	Roztok TMB (roztok substrátu).
H_2SO_4 **0,5M**	Kyselina sírová, 0,5molární (zastavovací roztok).
CAL **X** **LYO**	Lyofilizovaný kalibrátor.
CONTROL **L** **LYO**	Lyofilizovaná kontrola s nízkou koncentrací analytu.
CONTROL **H** **LYO**	Lyofilizovaná kontrola s vysokou koncentrací analytu.

	Kód šarže.
	Katalogové číslo.
	Datum použitelnosti.
	Teplotní omezení.
	Biologická rizika.
	Viz návod k použití.
	Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro.
	Výrobce.
	Varování.
	Obsah dostačuje pro 96 testů.
	Shoda se směrnicí 98/79/ES o diagnostických zdravotnických prostředcích in vitro.

Zestaw CgAnalyze

POLSKI

PRZEZNACZENIE

Zestaw CgAnalyze to test immunoenzymatyczny (ang. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) do wykrywania i oznaczania ilościowego chromograniny A w ludzkim osoczu i surowicy. Wyniki testu mogą być stosowane we wspomaganiu diagnostyki guzów neuroendokrynnych (ang. neuroendocrine tumour, NET) wydzielania chromograniny A, takich jak barwiaki i rakowiaki. Test jest przeznaczony do stosowania u pacjentów z objawami podmiotowymi i przedmiotowymi NET. Nie jest ono przeznaczone do badań przesiewowych populacji zdrowej.
Analiza powinna być wykonywana wyłącznie przez przeszkolony personel laboratoryjny.

WYŁĄCZNIE DO DIAGNOSTYKI *IN VITRO*.

PODSUMOWANIE I OBJAŚNIENIE

Chromograniny i sekretograniny stanowią rodzinę unikalnych kwaśnych białek, które są przechowywane jednocześnie z neurotransmiterami i hormonami peptydowymi w mózgu oraz rozproszonym układzie neuroendokrynnym (Winkler, H. & Fischer-Colbrie, R.1992). Pod względem strukturalnym białka te są produktami różnych genów, ale ogólnie mają pewne cechy wspólne, takie jak obfitość kwaśnych reszt aminokwasowych oraz kilka par zasadowych aminokwasów stanowiących potencjalne miejsca rozszczepiania potranslacyjnego. Chromograniny są przechowywane i uwalniane jednocześnie z neuropeptydami i hormonami w komórkach neuroendokrynnych w całym organizmie. Sugerowano rolę chromogranin w generowaniu ziaren hormonalnych i pakowaniu hormonów. Ponadto chromograniny mogą być rozszczepiane na mniejsze fragmenty, które mogą wykazywać aktywności biologiczne, takie jak inhibicja uwalniania hormonów, wazodylatacja i działanie przeciwdrobnoustrojowe (Stridsberg M, 2000).

Guzy pochodzenia neuroendokrynnego zazwyczaj występują przy zwiększonych stężeniach chromograniny A w surowicy/osoczu (O'Connor, DT, Deftos LJ, 1986). Guzy neuroendokrynne pochodzą z komórek neuroendokrynnych, a typowe guzy neuroendokrynne to rakowiaki, barwiaki, nerwiaki zarodkowe, drobnokomórkowy rak płuc, gruczolaki przytarczyc, guzy przysadki oraz guzy wysepek trzustkowych i obejmują zespoły MEN1 i MEN2. Obejmuje to także różne zespoły guzów neuroendokrynnych, czyli guzy gastrynowe, insulinomy, glukagonomy i somatostatynomy, objawowe wyspiaki wydzielające polipeptyd trzustkowy i inne niefunkcjonalne guzy neuroendokrynne (Eriksson, B. et al. 2000). W przypadku tych guzów wykazano, że chromogranina A jest najlepszym markerem krążeniowym (Bajetta, E. et al. 1999).

Zasada zestawu CgAnalyze

Na oddzielnych płytkach rozcieńczeń próbki pacjenta, kalibratory i kontrole są rozcieńczane 5x w rozcieńczalniku. Rozcieńczony materiał jest przenoszony na studzienki do mikromiareczkowania i inkubowany przez 60 minut w temperaturze pokojowej. Podczas tej pierwszej inkubacji przeciwciało monoklonalne wychwytuje na powierzchni studzienki chromograninę A. Po przemywaniu w celu usunięcia niezwiązanego materiału dodawane jest drugie przeciwciało znakowane peroksydazą chrzanową (ang. horseradish peroxidase, HRP) w celu wykrywania chromograniny A związanej do studzienki. Po inkubacji przez 30 minut studzienki są ponownie przemywane, dodawany jest substrat barwny i następuje inkubacja. Po 15 minutach reakcja barwna jest zatrzymywana i barwa jest oznaczana w spektrofotometrze. Barwa jest wprost proporcjonalna do ilości chromograniny A związanej do studzienki. Ilość chromograniny A jest oznaczana przez porównanie z barwą w próbkach kalibratora.

Kalibrator w zestawie to peptyd syntetyczny będący odpowiednikiem chromograniny A. Kalibrator peptydowy jest ustawiony tak, aby dawać odpowiedź równą oczyszczonemu, natywnemu fragmentowi chromograniny A (Stridsberg, M et al. 1993, Stridsberg et al. 1995)

OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

- Wyłącznie do diagnostyki *in vitro*.
- Odczynniki oznaczenia nie zawierają składników pochodzenia ludzkiego, ale analizowane osocza pacjentów powinny być traktowane jako zdolne do przenoszenia czynników zakaźnych.
- Ośrodki ds. zwalczania i zapobiegania chorobom (ang. Centers for Disease Control and Prevention) oraz Krajowe instytuty ds. zdrowia (ang. National Institutes of Health) zalecają, aby czynniki potencjalnie zakaźne traktować przy poziomie bezpieczeństwa biologicznego 2.
- Większość roztworów zestawu zawiera ProClin 300 jako środek konserwujący. Nigdy nie pipetować ustami i nie dopuścić, aby odczynniki lub próbki pacjenta zetknęły się ze skórą. Odczynniki zawierające ProClin 300 mogą działać drażniąco. Unikać kontaktu ze skórą i oczami. W przypadku kontaktu spłukać dużą ilością wody.
- Roztwór zatrzymujący zawiera 0,5 M kwasu siarkowego. Nie dopuszczać, aby odczynniki zetknęły się ze skórą.
- Stężenia chromograniny A w danej próbce badanej za pomocą testów różnych producentów mogą różnić się ze względu na różnice metod testów oraz swoistość odczynników.
- Wszystkie odpady należy traktować jako odpady niebezpieczne.
- Karty charakterystyki dla wszystkich składników niebezpiecznych zawartych w tym zestawie są dostępne na żądanie w firmie Dako Denmark A/S.

CAL	X	LYO
DIL		
CONJ	100X	

CONTROL	L	LYO
CONTROL	H	LYO

Ostrzeżenie

Zawiera ProClin 300:
Masa reakcyjna: 5-chloro-2-metylo-4-izotiazolino-3-onu [nr WE 247-500-7] i 2-metylo-4-izotiazolino-3-onu [nr WE 220-239-6] (3:1)

H317:	Może powodować reakcję alergiczną skóry.
P264:	Dokładnie umyć ręce po użyciu.
P280:	Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.
P302+352:	W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ NA SKÓRĘ: Umyć dużą ilością wody z mydłem.
P333+313:	W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: Zasięgnąć porady/ zgłosić się pod opiekę lekarza.

POBIERANIE PRÓBKI

Zestaw CgAnalyze jest zalecany do próbek surowicy/osocza pobieranego na EDTA/heparynę.
Traktować jako zdolne do przenoszenia czynników zakaźnych.
Próbki są rozdzielane przez wirowanie i mogą być przechowywane w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie 7 dni. Jeżeli próbki będą przechowywane przez dłuższy czas, należy je przechowywać w temperaturze -20°C lub niższej. Próbki mogą przechodzić trzy cykle zamrażania/rozmrażania bez pogorszenia jakości.
Nie należy używać zamrażarki bezszronowej, ponieważ może ona poddawać próbki cyklom zamrażania/rozmrażania niszcząc przeciwciała. Próbki, które są nieprawidłowo

przechowywane lub są poddawane wielu cyklom zamrażania/rozmrażania mogą dawać nieprawdziwe wyniki.

SKŁADNIKI ZESTAWU I PRZECHOWYWANIE ODCZYNNIKÓW

- Jedna ramka z 96 studzienkami szczelnie zamkniętymi w opakowaniu foliowym z pakietem osuszającym.
- Sześć fiolek z liofilizowanymi kalibratorami zawierającymi ludzką chromograninę A w rozcieńczalniku. CAL 1 = 0 ng/ml (rozcieńczalnik), CAL 2 = 36 ng/ml, CAL 3 = 180 ng/ml, CAL 4 = 540 ng/ml, CAL 5 = 1080 ng/ml, CAL 6 = 1800 ng/ml.
- Jedna fiolka z liofilizowaną kontrolą niską (L), kolor zielony.
- Jedna fiolka z liofilizowaną kontrolą wysoką (H), kolor czerwony.
- 30 ml rozcieńczalnika (DIL) zawierającego znakowane biotyną przeciwciała przeciwko chromograninie A , kolor czerwony. Gotowy do użycia.
- 150 µl koniugatu (CONJ) zawierającego znakowane HRP przeciwciała przeciwko chromograninie A. Stężone 100x.
- 15 ml buforu koniugatu (kolor niebieski). Gotowy do użycia.
- 15 ml substratu TMB. Gotowy do użycia.
- 15 ml roztworu zatrzymującego (0,5M H_2SO_4). Gotowy do użycia.
- 2 x 35 ml roztworu płuczącego, stężone 20x.

Przed użyciem

Liofilizowane kalibratory i kontrole powinny być ostrożnie rozpuszczone w 300 µl wody destylowanej. Rekonstytuowane kalibratory i kontrole powinny być po użyciu przechowywane w temperaturze -20°C lub niższej. Kalibratory i kontrole mogą przechodzić trzy cykle zamrażania/rozmrażania bez pogorszenia jakości.
Inne odczynniki w zestawie powinny być przechowywane w temperaturze 2–8°C.
Rekonstytuowane kalibratory i kontrole powinny być przed każdym badaniem rozcieńczane 5x.
Ilość koniugatu potrzebnego do każdej analizy powinna być przed użyciem rozcieńczona 100x (10 µl koniugatu + 990 µl buforu koniugatu na pasek). Pozostały bufor należy odrzucić.
Roztwór płuczący powinien być przed użyciem rozcieńczony 20x. Rozcieńczyć 10 ml stężonego 20x roztworu płuczącego w 190 ml wody destylowanej. W przypadku przechowywania w temperaturze 2–8°C rozcieńczony roztwór płuczący jest stabilny do upływu daty ważności zestawu.
Pozostałe odczynniki w zestawie są gotowe do użycia.
Wyjąć tylko liczbę studzienek potrzebną do badania i ostrożnie ponownie zamknąć aluminiowe opakowanie.

Materiały lub sprzęt wymagany, ale niedostarczony

- Czytnik mikropłytek z filtrem 450 nm. Referencyjna długość fali to 620 nm.
- 300 µl/studzienkę płytki rozcieńczeń w celu rozcieńczania kalibratora, próbek pacjenta i kontroli.
- Precyzyjne pipety z końcówkami jednorazowymi.
- Automatyczna płuczka do płytki do mikromiareczkowania, chusteczki pochłaniające, probówki i stoper.

PROCEDURA

Wszystkie roztwory powinny być stosowane w temperaturze pokojowej. Inkubować wszystkie etapy w temperaturze pokojowej (20–30°C).

Rozcieńczanie i inkubacja próbek

Przed przeniesieniem na płytkę testową rozcieńczyć wszystkie próbki 5x w oddzielnej płytce do rozcieńczeń. Kalibratory, kontrolę niską, kontrolę wysoką i osocze pacjenta należy

rozcieńczyć za pomocą 50 µl osocza + 200 µl rozcieńczalnika. Dokładnie wymieszać pipetując do góry i w dół przed przeniesieniem 100 µl w powtórzeniu na płytkę testową zgodnie ze schematem poniżej.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CAL 1	CAL 5	P1									
B	CAL 1	CAL 5	P1									
C	CAL 2	CAL 6	P2									
D	CAL 2	CAL 6	P2									
E	CAL 3	H	itd.									
F	CAL 3	H										
G	CAL 4	L										
H	CAL 4	L										

Inkubować przez 60 minut.

Po inkubacji próbki
Płukać trzy (3) razy za pomocą 300 µl roztworu płuczącego/studzienkę, za każdym razem napełniając i opróżniając studzienki. Po ostatnim płukaniu opróżnić studzienki stukając płytką do mikromiareczkowania w chusteczkę pochłaniającą.

Dodawanie koniugatu
Do każdej probówki dodać 100 µl koniugatu.
Inkubować przez 30 minut.

Po inkubacji koniugatu
Płukać jak wcześniej.

Dodawanie roztworu substratu
Do każdej studzienki dodać 100 µl substratu TMB, inkubować w ciemności przez 15 minut. Czas inkubacji można skrócić do 10 minut, jeżeli maksymalna gęstość optyczna (ang. Optical Density, OD) przekracza 3,0 przy górnych wartościach temperatury lub jeżeli stosowana jest metoda automatyczna.

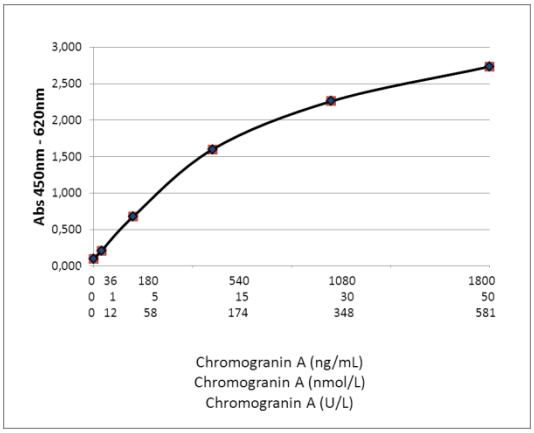
Dodawanie roztworu zatrzymującego
Do każdej probówki dodać 100 µl roztworu zatrzymującego. W ciągu 2 godzin odczytać absorbancję na czytniku mikropłytek przy 450 nm. Odczytać przy 620 nm referencyjną długość fali.

Obliczenia
Skonstruować krzywą kalibracyjną wykreślając OD wobec wartości ng/ml sześciu kalibratorów. Sześć dostarczonych kalibratorów ma wartości odpowiednio 0 ng/mL dla kalibratora 1, 36 ng/ml dla kalibratora 2, 180 ng/ml dla kalibratora 3, 540 ng/ml dla kalibratora 4, 1080 ng/ml dla kalibratora 5, 1800 ng/mL dla kalibratora 6. Odczytać z krzywej wartości kontroli niskiej i wysokiej oraz próbek pacjenta.

Wartości wyższe od najwyższej wartości kalibratora powinny być zgłaszane jako >1800 ng/ml lub dalej rozcieńczane za pomocą rozcieńczalnika oznaczenia i ponownie oznaczane. W tym przypadku należy dokonać kompensacji rozcieńczenia podczas obliczeń stężenia chromograniny A.
Proszę zwrócić uwagę: jeżeli wartości kalibratora 1 lub kalibratora 6 są poza zakresem, test należy uznać za nieważny i powtórzyć go.

Dla wygody obliczenia stężenia można przeprowadzić w ng/ml, nmol/l lub U/l. Jednostki podano w poniższej tabeli. Do konwersji zastosowano masę molekularną natywnego fragmentu chromograniny A (36 kDa) (Stridsberg, M et al. 1993, Stridsberg et al. 1995)

Kalibrator	**Stężenie**			**Absorbancja**
	ng/ml	nmol/l	U/l	
1	0	0	0	0,094
2	36	1	12	0,209
3	180	5	58	0,678
4	540	15	174	1,599
5	1080	30	348	2,259
6	1800	50	581	2,735



Próbka z wartością absorbancji 1,272 będzie odczytywana na osi X jako mająca 367 ng/ml (lub 10,2 nmol/l lub 118 U/l) chromograniny A. W tym przypadku zastosowano dopasowanie czteroparametrowej krzywej logistycznej.
Ważne: Krzywa stanowi przykład i nie należy jej stosować do interpretacji rzeczywistych próbek pacjentów.

Kontrola jakości
Wartość OD dla kalibratora 1 powinna być <0,15.
Wartość OD dla kalibratora 6 powinna być >1,0.
Wartości kontroli niskiej i wysokiej, patrz certyfikat serii.
Kontrole są przeznaczone do monitorowania znacznej wady odczynnika. Jeżeli dowolne wartości kontroli nie są w swych odpowiednich zakresach, test należy uznać za nieważny i powtórzyć go. Zgodnie z wytycznymi lub wymogami przepisów lokalnych, stanowych i/lub federalnych lub organizacji akredytujących można zbadać dodatkowe kontrole. Wytyczne dotyczące odpowiednich przepisów KJ, patrz NCCLS C24-A.

Efekt wysokiej dawki
Efektu wysokiej dawki nie obserwowano podczas badania stężeń chromograniny A maksymalnie do 360 000 ng/ml (lub 10 000 nmol/l lub 116 000 U/l).

OGRANICZENIA
Stężenia chromograniny A danego pacjenta nie można stosować jako miary ciężkości choroby. Nie można polegać na teście jako jedynej podstawie do decyzji odnośnie terapii klinicznej — należy go stosować w połączeniu z objawami klinicznymi i wynikami innych dostępnych testów.

Zakłócenia
Nie zaobserwowano zakłóceń po dodaniu do próbek osocza bilirubiny F (208 mg/l) , bilirubiny C (200 mg/l), hemoglobiny hemolitycznej (4,84 g/l) lub chłonki (1430 FTU). Osoby otrzymujące w celu leczenia lub diagnostyki mysie przeciwciała przeciwludzkie lub pacjenci narażeni w inny sposób na immunoglobuliny mysie mogą wytwarzać ludzkie przeciwciała przeciwmysie (ang. human anti-mouse antibodies, HAMA). Przeciwciała te mogą zakłócać oznaczenia wykorzystujące mysie przeciwciała monoklonalne i mogą powodować wyniki fałszywie podwyższone.

Wyniki oczekiwane
Zaleca się, aby każde laboratorium określiło własny zakres referencyjny dla powszechnie stosowanych próbek, ponieważ na wyniki mogą wpływać różnice w postępowaniu z próbkami. Zaleca się przestrzeganie ścisłej procedury pracy, takiej jak opisana powyżej. Podane niżej wartości są wskazaniem oczekiwanego zakresu referencyjnego i obliczone jako 97,5. percentyl 126 próbek osocza heparynowego krwiodawców (63 mężczyzn i 63 kobiet).

Zakres referencyjny stężenia chromograniny A w osoczu heparynowym: $\leq$ 108 ng/ml (lub 3,0 nmol/l lub 35 U/l).

Granica wykrywania
Granica wykrywania tego oznaczenia wynosi 19 ng/ml (lub 0,54 nmol/l lub 6 U/l). Jest to najniższe wykrywalne stężenie, które różni się od zera z prawdopodobieństwem 95%. Oznacza to, że aż do tego punktu można uzyskać wiarygodne pomiary nawet na próbkach ujemnych. Obliczenia przeprowadzono zgodnie z wytycznymi dokumentu EP17-A tom 24 nr 34 NCCLS.

Niezwiązane z guzami wzrosty stężenia chromograniny A
Podwyższone stężenia chromograniny A mogą występować u pacjentów o obniżonej czynności nerek, z zanikowym zapaleniem żołądka i u pacjentów z trwającym leczeniem za pomocą inhibitorów pompy protonowej.

CHARAKTERYSTYKA ANALITYCZNA

Tabela 1. Czułość i swoistość kliniczna

Czułość kliniczna
Oznaczono charakterystykę kliniczną łącznie 107 próbek osocza heparynowego. Wyniki zebrano w poniższej tabeli.

Grupy chorobowe	Liczba całkowita	Dodatnie >3,0 nmol/l	Ujemne ≤3.0 nmol/l	Czułość %
ECL	4	3	1	75
EPT	30	19	11	63
FGC	10	7	3	70
LC	9	4	5	44
MGC	47	28	19	60
NE Diff	6	2	4	33
Przyzwojak	1	1	0	100

ECL = Guzy enterochromafino-podobne
EPT = Guzy endokrynne trzustki
FGC = Rakowiak przedniej części prajelita
LC = Rakowiak płuca
MGC = Rakowiak jelita środkowego
NE Diff = Różnicowanie neurokrynne

Swoistość
Oznaczono 126 próbek osocza heparynowego od zdrowych krwiodawców, 126 próbek było ujemnych:

126/126 = 100% 95% CI = 97,1–100%

95% przedział ufności (ang. confidence interval, CI) obliczono wykorzystując metodę ścisłą.

Tabela 2. Precyzja międzyoznaczeniowa została oznaczona poprzez badanie sześciu różnych próbek w ośmiu powtórzeniach w trzech różnych dniach.

	1	2	3	4	5	6
Wartość średnia (ng/ml) SD % CV	150 14,0 9	209 10,8 5	316 28,3 9	486 41,7 9	838 80,6 10	1212 69,8 6

Tabela 3. Precyzja wewnątrzoznaczeniowa została oznaczona poprzez badanie sześciu różnych próbek w ośmiu powtórzeniach w jednym dniu.

	1	2	3	4	5	6
Wartość średnia (ng/ml) SD % CV	156 6,4 4	214 11,3 5	335 10,4 3	502 23,3 5	868 42,8 5	1255 101,4 8

Tabela 4. Zmienność między partiami została oznaczona poprzez badanie sześciu różnych próbek w ośmiu powtórzeniach dla trzech różnych partii.

	1	2	3	4	5	6
Wartość średnia (ng/ml) SD % CV	145 9,6 7	205 7,8 4	309 22,9 7	459 38,5 8	794 69,2 9	1165 78,1 7

Tabela 5. Odzysk rozcieńczenia oznaczono poprzez badanie pięciu rozcieńczeń seryjnych trzech różnych próbek.

Próbka	**Rozcieńczenie**	**Stężenie mierzone dla średniej (ng/ml)**	**Stężenie obliczone (ng/ml)**	**% odzysk skorygowany o rozcieńczenie**
1	1/5	1540	1540	100
	1/10	756	770	98
	1/20	366	385	95
	1/40	179	193	93
	1/80	90	96	94
Próbka	**Rozcieńczenie**	**Stężenie mierzone dla średniej (ng/ml)**	**Stężenie obliczone (ng/ml)**	**% odzysk skorygowany o rozcieńczenie**
2	1/5	1134	1134	100
	1/10	587	567	104
	1/20	278	283	98
	1/40	139	142	98
	1/80	72	71	101
Próbka	**Rozcieńczenie**	**Stężenie mierzone dla średniej (ng/ml)**	**Stężenie obliczone (ng/ml)**	**% odzysk skorygowany o rozcieńczenie**
3	1/5	1293	1293	100
	1/10	625	646	97
	1/20	292	323	90
	1/40	144	162	89
	1/80	76	81	94

ROZWIĄZYWANIE PROBLEMÓW

Problem	Możliwe przyczyny	Działanie naprawcze
Jeden lub więcej kalibratorów jest poza zakresem.	1. Nie dodano jednego lub więcej odczynników, lub dodano je w złej kolejności. 2. Nieprawidłowe pipetowanie.	1. Test nieważny. Powtórzyć test. 2. Test nieważny. Powtórzyć test.
Wartości kontroli poza zakresem.	1. Nieprawidłowa temperatura, czasy lub pipetowanie; odczynniki nie są wymieszane. 2. Zanieczyszczenie krzyżowe kontroli. 3. Nieprawidłowe rozcieńczenie. 4. Ścieżka optyczna nie jest czysta.	1. Sprawdzić, czy czas i temperatura były prawidłowe. Patrz „Słaba precyzja” poniżej. Powtórzyć test. 2. Uważnie pipetować. 3. Powtórzyć test. 4. Sprawdzić występowanie zabrudzeń lub pęcherzyków powietrza w studzienkach. Wytrzeć spód płytki i ponownie odczytać.
Wszystkie testy dają wynik pusty.	1. Nie dodano jednego lub więcej odczynników, lub dodano je w złej kolejności. 2. Nieaktywna płytka powlekana.	1. Ponownie sprawdzić procedurę. Sprawdzić pod kątem niezużytych odczynników. Powtórzyć test. 2. Sprawdzić, czy w nieużywanych płytkach nie ma wilgoci. Wytrzeć spód płytki i ponownie odczytać.
Wszystkie testy dają wyniki żółte.	1. Zanieczyszczone bufory lub odczynniki. 2. Zanieczyszczony roztwór płuczący. 3. Nieprawidłowe rozcieńczenie surowicy.	1. Sprawdzić wszystkie odczynniki pod kątem zmętnienia lub nieprzyjemnego zapachu. 2. Użyć czystego pojemnika. Sprawdzić jakość roztworu wodnego użytego do przygotowywania. 3. Powtórzyć test.
Maksymalne OD jest podwyższone (przekracza 3,0)	1. Zbyt wysokie temperatury inkubacji/użycie metody zautomatyzowanej.	1. Zmniejszyć czas inkubacji substratu.
Słaba precyzja.	1. CV pipety podającej wyższe niż 5%. 2. Próbka lub odczynniki nie są wystarczająco wymieszane lub nie są doprowadzone do temperatury pokojowej. 3. Dodawanie odczynnika trwało zbyt długo; niespójność odstępów.	1. Sprawdzić kalibrację pipety. Użyć powtarzalnej techniki. 2. Wymieszać delikatnie, ale dokładnie wszystkie odczynniki i doprowadzić je do temperatury pokojowej. 3. Opracować jednorodną technikę i stosować urządzenie wielokońcówkowe lub dozownik automatyczny w celu skrócenia czasu.

	4. Ścieżka optyczna nie jest czysta.	4. Sprawdzić występowanie pęcherzyków powietrza w studzienkach. Wytrzeć spód płytki i ponownie odczytać.
	5. Płukanie niejednorodne; uwięzione pęcherzyki powietrza; roztwór płuczący pozostał w studzienkach.	5. Sprawdzić, czy wszystkie studzienki są wypełnione i jednorodnie zasysane. Dozować ciecz powyżej poziomu odczynnika w studzience. Po ostatnim płukaniu opróżnić studzienki stukając płytką do mikromiareczkowania w chusteczkę pochłaniającą.
	6. Nieprawidłowe pipetowanie.	6. Unikać pęcherzyków powietrza w końcówkach pipety.

PIŚMIENNICTWO

15. Bajetta, E., Ferrari, L., Martinetti, A., Celio, L., Procopio, G., Artale, S., Zilembo, N., Di Bartolomeo, M., Seregni, E. and Bombardieri, E.
Chromogranin A, neuron specific enolase, carcinoembryonic antigen, and hydroxyindole acetic acid evaluation in patient with neuroendocrine tumours.
Cancer 1999, ***86:****858-865.*

16. Eriksson, B., Öberg, K. and Stridsberg, M.
Tumour markers in neuroendocrine tumours.
Digestion 2000, ***62:****33-38.*

17. O'Connor, D.T. and Deftos, L.J.
Secretion of chromogranin A by peptide-producing endocrine neoplasms.
New England Journal of Medicine 1986, ***314:****1145-1151.*

18. Stridsberg, M., Hellman, U., Wilander, E., Lundqvist, G., Hellsing, K. and Öberg, K.
Fragments of chromogranin A are present in the urine of patients with carcinoid tumours: Development of a specific radioimmunoassay for chromogranin A and its fragments.
Journal of Endocrinology 1993, **139:**329-337.

19. Stridsberg, M., Öberg, K., Li, Q., Engström, U. and Lundqvist, G.
Measurements of chromogranin A, chromogranin B (secretogranin I), chromogranin C (secretogranin II) and pancreastatin in plasma and urine from patients with carcinoid tumours and endocrine pancreatic tumours.
Journal of Endocrinology 1995, ***144:****49-59.*

20. Stridsberg, M.
Measurements of chromogranins and chromogranin-related peptides by immunological methods.
Advanced Experimental and Medical Biology 2000, ***482:****319-327.*

21. Winkler, H. and Fischer-Colbrie, R.
The chromogranin A and B: The first 25 years and future perspectives.
Neuroscience 1992, ***49:****497-528.*

OBJAŚNIENIE SYMBOLI

Ag	Antygen (płytka powlekana).
DIL	Rozcieńczalnik.
BUF **CONJ**	Bufor koniugatu.
CONJ **100X**	Koniugat HRP stężony 100x.
BUF **WASH** **20X**	20x koncentrat buforu płuczącego.
SUBS **TMB**	Roztwór TMB (roztwór substratu).
H_2SO_4 **0,5M**	Kwas siarkowy, 0,5 molowy (roztwór zatrzymujący).
CAL **X** **LYO**	Liofilizowany kalibrator.
CONTROL **L** **LYO**	Liofilizowana kontrola niska.
CONTROL **H** **LYO**	Liofilizowana kontrola wysoka.

	Numer partii.
	Numer katalogowy.
	Termin przydatności do użytku.
	Ograniczenie temperatury.
	Zagrożenie biologiczne.
	Skonsultować się z instrukcją użycia.
	Wyrób medyczny do diagnostyki *in vitro*.
	Producent.
	Ostrzeżenie.
	Wystarcza na 96 testów.
	Zgodność z dyrektywą 98/79/WE w sprawie wyrobów medycznych używanych do diagnozy in vitro .

CgAnalyze Kit

PORTUGUÊS

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O kit de CgAnalyze é um ensaio de imunoabsorção ligada a enzima (ELISA) para a detecção e quantificação da cromogranina A em plasma ou soro humano. Os resultados do ensaio podem ser utilizados para ajudar a diagnosticar os tumores neuroendócrinos (TNEs) secretores de cromogranina A como, por exemplo, feocromocitomas e carcinóides. O ensaio destina-se a ser utilizado em pacientes com sinais e sintomas consistentes com os TNEs. Não se destina a fazer o rastreio de uma população saudável.
A análise deve ser efectuada por pessoal de laboratório com a devida formação.

PARA UTILIZAÇÃO DIAGNÓSTICA *IN VITRO.*

RESUMO E EXPLICAÇÃO

As cromograninas e as secretograninas constituem uma família de proteínas singularmente ácidas que são armazenadas em conjunção com os neurotransmissores e as hormonas péptidas no cérebro e sistema neuroendócrino difuso (Winkler, H. e Fischer-Colbrie, R. 1992). Estruturalmente, estas proteínas são produtos de diferentes genes mas têm em comum algumas propriedades gerais, como uma abundância de resíduos ácidos de aminoácidos bem como vários pares de aminoácidos básicos como posições potenciais para a clivagem pós-translacional. As cromograninas são co-armazenadas e co-libertadas com os neuropéptidos e com as hormonas, nas células neuroendócrinas espalhadas pelo corpo. Uma das funções das cromograninas é a geração de grânulos hormonais, tendo já sido sugerido o empacotamento de hormonas. Além disso, as cromograninas podem ser clivadas, resultando em fragmentos mais pequenos que podem exibir actividades biológicas como a inibição da libertação hormonal, a vasodilatação e efeitos anti-microbiológicos (Stridsberg M, 2000).

Os tumores de origem neuroendócrina apresentam-se normalmente com níveis mais elevados de cromogranina A no soro/plasma (O'Connor, DT, Deftos LJ, 1986). Os tumores neuroendócrinos são derivados das células neuroendócrinas, sendo os tumores neuroendócrinos típicos tumores carcinóides, feocromocitomas, neuroblastomas, cancros de célula pequena do pulmão, adenomas hiperparatiróides, tumores da pituitária e tumores das ilhotas pancreáticas e incluem os síndromes MEN1 e MEN2. Este grupo inclui ainda os diferentes síndromes tumorais neuroendócrinos, nomeadamente os gastrinomas, insulinomas, glucagonomas, somatostatinomas, PPomas e os tumores neuroendócrinos não funcionais (Eriksson, B. et al. 2000). Nestes tumores, a cromogranina A demonstrou ser o melhor marcador circulante (Bajetta, E. et al. 1999).

Princípio da CgAnalyze Kit

Numa placa de diluição em separado, diluem-se as amostras do paciente, os calibradores e os controlos 5 vezes em diluente. O material diluído é então transferido para as poços de microtitulação e incubado à temperatura ambiente durante 60 minutos. Durante esta primeira incubação, um anticorpo monoclonal captura a cromogranina A e fixa-a à superfície do poço. Depois de lavar para remover o material não ligado, adiciona-se um segundo anticorpo monoclonal marcado com peroxidase de rábano (HRP, *horseradish peroxidase*), para detectar a cromogranina A ligada ao poço. Depois de incubar durante 30 minutos, lavam-se de novo os poços e adiciona-se-lhes um substrato de cor, incubando-se a seguir os poços. O desenvolvimento da cor deve ser interrompido passados 15 minutos, medindo-se então a cor num espectro fotómetro. A cor é directamente proporcional à quantidade de cromogranina A ligada ao poço. A quantidade de cromogranina é determinada por comparação com o desenvolvimento de cor das amostras do calibrador.

O calibrador incluído no kit é um péptido sintético que corresponde à cromogranina A. o calibrador de péptido encontra-se regulado de forma a dar uma reacção semelhante a um fragmento nativo e purificado de cromogranina A (Stridsberg, M. et al. 1993, Stridsberg et al. 1995)

AVISOS E PRECAUÇÕES

- Para utilização diagnóstica *in vitro*.
- Os reagentes do ensaio não contêm componentes de soro humano mas os plasmas de pacientes analisados devem ser manuseados como se tivessem a capacidade de transmitir agentes infecciosos.
- Os Centros para Controlo e Prevenção de Doenças e os Institutos Nacionais de Saúde recomendam que os agentes potencialmente infecciosos sejam processados ao nível 2 de segurança biológica.
- A maior parte das soluções do kit contêm ProClina 300 como produto conservante. Nunca pipetar com a boca nem permitir que os reagentes ou a amostra do doente entrem em contacto com a pele. Os reagentes contendo ProClina 300 podem ser irritantes. Evitar o contacto com a pele e os olhos. Em caso de contacto, lavar com muita água.
- A solução de paragem contém 0,5m de ácido sulfúrico. Não permitir que o reagente entre em contacto com a pele.
- As concentrações de cromogranina A numa dada amostra determinada com ensaios de diferentes fabricantes podem variar, devido às diferenças entre métodos de análise e à especificidade dos reagentes.
- Todos os resíduos devem ser manuseados como se fossem resíduos perigosos.
- As fichas dos dados de segurança do material relativas a todos os componentes perigosos incluídos neste kit estão disponíveis sob pedido junto da Dako Denmark A/S.

Atenção

CAL	X	LYO
DIL		
CONJ	100X	

CONTROL	L	LYO
CONTROL	H	LYO

Contém ProClin 300:
A reacção de massa: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)

H317:	Pode provocar uma reacção alérgica cutânea.
P264:	Lavar as mãos cuidadosamente após manuseamento.
P280:	Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.
P302+352:	SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar com sabonete e água abundantes.
P333+313:	Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico.

RECOLHA DA AMOSTRA

Recomenda-se o CgAnalyze Kit para soro/EDTA/plasma-heparina.
Manusear como se tivesse a capacidade de transmitir agentes infecciosos.
Evitar utilizar amostras que sejam ictéricas, lipémicas ou hemolizadas.
As amostras são separadas por centrifugação e podem ser armazenadas a 2-8º C durante um máximo de 7 dias. Se for necessário armazenar as amostras durante períodos mais longos, armazenar a -20º C ou menos. As amostras podem passar por 3 ciclos de congelamento/descongelamento sem se deteriorarem.

Não utilizar um congelador livre de gelo pois poderá permitir que as amostras passem por vários ciclos de congelamento e descongelamento, degradando assim o anticorpo. As amostras que sejam incorrectamente armazenadas ou sejam sujeitas a múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento podem originar resultados falsos.

COMPONENTES DO KIT E ARMAZENAGEM DOS REAGENTES

- Uma armação com 96 poços, fechada dentro de um pacote de película metalizada com um pacote dessecante.
- Seis frascos com calibradores liofilizados contendo Cromogranina A humana em diluente. CAL 1 = 0 ng/ml (diluente), CAL 2 = 36 ng/ml, CAL 3 = 180 ng/ml, CAL 4 = 540 ng/ml, CAL 5 = 1080 ng/ml, CAL 6 = 1800 ng/ml.
- Um frasco com controlo baixo liofilizado (L), de cor verde.
- Um frasco com controlo alto liofilizado (H), de cor vermelha.
- 30 ml de Diluente (DIL) , contendo anticorpos de cromogranina A marcados com biotina, de cor vermelha. Pronto a utilizar.
- 150 µl de conjugado (CONJ) contendo anticorpos de cromogranina A marcados com HRP. Concentrado 100 vezes.
- 15 ml de tampão conjugado (de cor azul). Pronto a utilizar.
- 15 ml de substrato TMB. Pronto a utilizar.
- 15 ml de solução de paragem (0,5m H_2SO_4). Pronto a utilizar.
- 2 x 35 ml de solução de lavagem, concentrada 20 vezes.

Antes de utilizar

Dissolver cuidadosamente os calibradores e controlos liofilizados em 300 µl de água destilada. Depois de utilizados, os calibradores e os controlos reconstituídos devem ser armazenados a -20º C ou menos. Os calibradores e os controlos podem passar por 3 ciclos de congelamento/descongelamento sem se deteriorarem.
Os restantes reagentes do kit devem ser armazenados a 2-8º C.
Os calibradores e controlos reconstituídos devem ser diluídos 5 vezes em diluente de cada vez que se efectuar um teste.
A quantidade de conjugado necessária para cada análise deve ser diluída 100 vezes antes de ser utilizada (10 ul de conjugado + 990 ul de tampão conjugado por tira).
O resto de conjugado diluído deve ser descartado. A solução de lavagem deve ser diluída 20 vezes antes de cada utilização. Diluir 10 ml da solução de lavagem concentrada 20 vezes em 190 ml de água destilada. Quando armazenada a uma temperatura de 2-8º C, a solução de lavagem diluída permanece estável até ao fim do prazo de validade do kit.
Os restantes reagentes do kit estão prontos para serem utilizados.
Remover apenas o número de poços necessário para a análise, voltando a fechar cuidadosamente o pacote de película metálica.

Materiais ou equipamento necessários mas não fornecidos:

- Leitor de micro placas com filtro de 450 nm. Comprimento de onda de referência: 620 nm.
- 300 µl por poço em placa de diluição para diluição do calibrador, amostras de pacientes e controlos.
- Pipetas de precisão com pontas descartáveis.
- Lavador de placas de microtitulação automáticos, tecido absorvente, tubos e um cronómetro.

PROCEDIMENTO

Todas as soluções devem ser empregadas à temperatura ambiente. Incubar todas as etapas à temperatura ambiente (20 a 30º C).

Diluição e incubação das amostras
Diluir todas as amostras 5 vezes numa placa de diluição em separado antes de transferir para a placa da análise. Os calibradores, controlo baixo, controlo alto e plasma do paciente devem ser diluídos à razão de 50 µl de plasma para 200 µl de diluente. Misturar muito bem, pipetando para cima e para baixo, antes de transferir 100 µl em duplicado para a placa da análise, conforme o diagrama apresentado a seguir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CAL1	CAL5	P1									
B	CAL1	CAL5	P1									
C	CAL2	CAL6	P2									
D	CAL2	CAL6	P2									
E	CAL3	H	Etc.									
F	CAL3	H										
G	CAL4	L										
H	CAL4	L										

Incubar durante 60 minutos.

Após a incubação da amostra
Lavar três (3) vezes com 300 µl de solução de lavagem por poço, enchendo e esvaziando os poços de cada vez. Após a última lavagem, esvaziar os poços, dando ligeiras pancadas com a placa em tecido absorvente.

Adição de conjugado
Adicionar 100 µl de conjugado a cada poço.
Incubar durante 30 minutos.

Após a incubação do conjugado
Lavar tal como indicado anteriormente.

Adição da solução de substrato
Adicionar 100 µl de substrato TMB a cada poço, incubar em lugar escuro durante 15 minutos. O tempo de incubação pode ser diminuído para 10 minutos se a OD máxima exceder 3,0 a altas temperaturas ou se for utilizado um método automatizado.

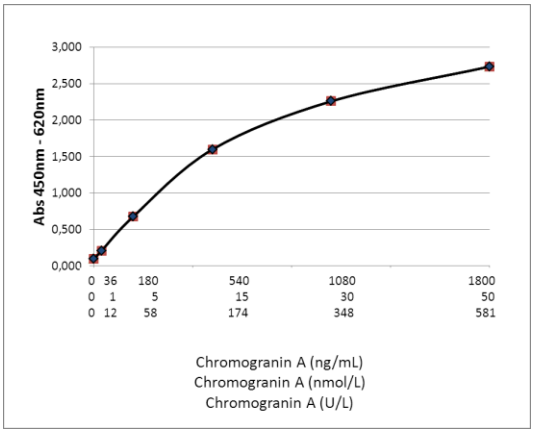
Adição da solução de paragem
Adicionar 100 µl de solução de lavagem a cada poço. Fazer a leitura da absorvência a 450 nm no prazo de 2 horas, num leitor de micro placas. Ler a 620 nm como comprimento de ondas de referência.

Cálculos
Traçar uma curva de calibração, projectando para tal a informação de saída (OD) contra os valores em ng/ml dos seis calibradores. Os seis calibradores fornecidos têm os valores 0 ng/ml para o calibrador 1, 36 ng/ml para o calibrador 2, 180 ng/ml para o calibrador 3, 540 para o calibrador 4, 1080 ng/ml para o calibrador 5 e 1800 ng/ml para o calibrador 6, respectivamente. Ler os valores dos controlos Baixo e Alto, bem como as amostras do paciente, a partir da curva.

Os valores mais elevados do que o valor do calibrador mais elevados devem ser registados como sendo >1080 ng/ml, ou devem ser mais diluídos com diluente de ensaios e novamente analisados. Neste caso, a compensação para a diluição deve ser feita no cálculo da concentração de cromogranina A. Atenção ao facto de que, no caso dos valores do calibrador 1 ou do calibrador 6 se enquadrarem fora da amplitude, a análise deve ser considerada inválida e deve ser repetida.

Por uma questão de conveniência, as concentrações podem ser calculadas em ng/ml, em nmol/l ou em U/L. Todas as unidades são apresentadas na tabela abaixo. Utilizou-se para a conversão o peso molecular do fragmento de origem da cromogranina A (36 kDa) (Stridsberg, M et al. 1993, Stridsberg et al. 1995).

Calibrador	Concentração			Absorvência
	ng/ml	nmol/l	U/L	
1	0	0	0	0,094
2	36	1	12	0,209
3	180	5	58	0,678
4	540	15	174	1,599
5	1080	30	348	2,259
6	1800	50	581	2,735



Uma amostra com um valor de absorvência de 1,272 apresentará, no eixo X, o valor de 367 ng/ml (ou 10,2 nmol/l, ou 118 U/L) de cromogranina A. Aplicou-se, neste exemplo, um ajuste à curva logística de 4 parâmetros.
Importante: A curva é um exemplo e não deve ser utilizada para efectuar a interpretação efectiva de amostras dos pacientes.

Controlo da Qualidade

A informação de saída (OD) do calibrador 1 deve ser <0,15.
A informação de saída (OD) do calibrador 6 deve ser >1,0.
Para determinar os valores dos controlos Baixo e Alto, consultar o certificado do lote.
Os controlos servem para monitorizar casos de falha considerável do reagente. No caso de quaisquer dos valores de controlo não se enquadrarem dentro das suas respectivas amplitudes, a análise deve ser considerada inválida e deve ser repetida. Podem analisar-se controlos adicionais de acordo com as directrizes ou requisitos dos regulamentos locais, regionais e/ou nacionais ou das organizações de acreditação. Consultar o NCCLS C24-A que contém informações de orientação sobre as práticas apropriadas de controlo da qualidade.

Efeito gancho

Não se observa qualquer efeito gancho ao analisar concentrações de cromogranina A de até 360 000 ng/ml (ou 10 000 nmol/l, ou 116 000 U/L).

LIMITAÇÕES

Não foram detectadas interferências quando se adicionou bilirrubina F (208 mg/l), bilirrubina C (200 mg/l), hemoglobina hemolítica (4,84 g/l) ou quilo (1430 FTU) às amostras de plasma.
O nível de cromogranina A do paciente individual não pode ser utilizado por si próprio como medida da gravidade da doença. Não se deve contar com a análise como base única das decisões a tomar sobre a terapia médica; a análise serve para ser utilizada em combinação com os sintomas clínicos e os resultados de outras análises disponíveis.

Interferência
Os indivíduos a receber anticorpos de rato anti-humanos, para tratamento ou diagnóstico, ou os pacientes que tenham, de outra forma, sido expostos à imunoglobulina do rato, poderão produzir HAMA (anticorpos anti-rato humanos). Estes anticorpos podem interferir com os ensaios que utilizem anticorpos monoclonais de rato e podem dar resultados falsamente elevados.

Resultados previstos
Recomenda-se que cada laboratório estabeleça uma amplitude de referência com amostras normalmente utilizadas, pois as variações no manuseamento das amostras podem afectar os resultados. Deve adoptar-se uma rotina muito estrita para manuseamento das amostras, conforme recomendado acima. Os valores abaixo indicados servem como indicação da amplitude de referência prevista e calculada como sendo o 97,5º percentil de 126 amostras de plasma heparinizado de doadores de sangue (63 homens e 63 mulheres).

Nível da amplitude de referência da cromogranina A: ≤ 108 ng/ml (ou 3,0 nmol/l, ou 35 U/L).

Limite de Detecção
O limite de detecção deste ensaio é de 19 ng/ml (ou 0,54 nmol/l, ou 6 U/L). Esta concentração é a mais baixa detectável que difere de zero com uma probabilidade de 95%. Isto significa que se podem tirar medidas fiáveis até este ponto mínimo, mesmo em amostras negativas. O cálculo foi efectuado de acordo com a directriz EP17-A vol. 24 n.º 34 do NCCLS.

Aumento da cromogranina A não associado à presença de um tumor
Pode verificar-se um aumento do nível de cromogranina A em pacientes com uma diminuição da função renal, pacientes com gastrite atrófica e pacientes em tratamento contínuo com fármacos inibidores da bomba de protões.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Quadro 1. Sensibilidade clínica e especificidade.

Sensibilidade clínica
Analisaram-se ao todo 107 amostras de plasma heparina com caracterização clínica. O quadro que se segue apresenta um resumo dos resultados:

Grupos de doenças	Número total	Positivo > 3,0 nmol/l	Negativo ≤ 3,0 nmol/l	Sensibilidade %
ECL	4	3	1	75
EPT	30	19	11	63
FGC	10	7	3	70
LC	9	4	5	44
MGC	47	28	19	60
NE Diff	6	2	4	33
Paraganglioma	1	1	0	100

ECL = Tumores do tipo enterocromafina
EPT = Tumor pancreático endócrino
FGC = Carcinóide do intestino anterior
LC = Carcinóide pulmonar
MGC = Carcinóide do intestino médio
NE Diff = Diferenciação neurócrina

Especificidade
Analisaram-se 126 amostras de plasma heparina de doadores de sangue aparentemente saudáveis e 126 das amostras deram resultados negativos:
126/126 = 100 % 95% CI = 97,1% - 100%

O intervalo de confiança (IC) de 95% foi calculado por meio do método exacto.

Quadro 2. A precisão entre análises foi determinada por meio de análises feitas a seis amostras diferentes em oito réplicas e em três ocasiões diferentes.

	1	2	3	4	5	6
Valor médio (ng/ml)	150	209	316	486	838	1212
SD	14,0	10,8	28,3	41,7	80,6	69,8
% CV	9	5	9	9	10	6

Quadro 3. A precisão em cada análise foi determinada por meio de análises feitas a seis amostras diferentes em oito réplicas e uma ocasião.

	1	2	3	4	5	6
Valor médio (ng/ml)	156	214	335	502	868	1255
SD	6,4	11,3	10,4	23,3	42,8	101,4
% CV	4	5	3	5	5	8

Quadro 4. A variação de lote para lote foi determinada por meio de análises feitas a seis amostras diferentes em três lotes diferentes.

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Valor médio (ng/ml)	145	205	309	459	794	1165
SD	9,6	7,8	22,9	38,5	69,2	78,1
% CV	7	4	7	8	9	7

Quadro 5. A recuperação da diluição foi determinada por meio de análises feitas a cinco diluições em série de três amostras diferentes.

Amostra	**Diluição**	**Concentração média medida (ng/ml)**	**Concentração calculada (ng/ml)**	**% de Recuperação corrigida da diluição**
1	1/5	1540	1540	100
	1/10	756	770	98
	1/20	366	385	95
	1/40	179	193	93
	1/80	90	96	94
Amostra	**Diluição**	**Concentração média medida (nmol/l)**	**Concentração calculada (nmol/l)**	**% de Recuperação corrigida da diluição**
2	1/5	1134	1134	100
	1/10	587	567	104
	1/20	278	283	98
	1/40	139	142	98
	1/80	72	71	101
Amostra	**Diluição**	**Concentração média medida (ng/ml)**	**Concentração calculada (ng/ml)**	**% de Recuperação corrigida da diluição**
3	1/5	1293	1293	100
	1/10	625	646	97
	1/20	292	323	90
	1/40	144	162	89
	1/80	76	81	94

RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

Problema	Causas possíveis	Acção de correcção
Um ou mais calibradores fora da amplitude.	1. Um ou mais reagentes não foi/foram adicionados ou foi/foram adicionados na sequência incorrecta. 2. Pipetagem inadequada.	1. Análise inválida. Repetir a análise. 2. Análise inválida. Repetir a análise.
Valores de controlo fora da amplitude.	1. Temperatura, cronometragem ou pipetagem incorrectas; reagentes não misturados. 2. Contaminação cruzada dos controlos. 3. Diluição inadequada. 4. Via óptica não limpa.	1. Verificar se o tempo e a temperatura estavam correctos. Consultar "Pouca precisão", abaixo. Repetir a análise. 2. Pipetar cuidadosamente. 3. Repetir a análise. 4. Verificar se os poços contêm impurezas ou bolhas de ar. Limpar o fundo da placa e ler novamente.
Todos os resultados dos testes em branco.	1. Um ou mais reagentes não foi/foram adicionados ou foi/foram adicionados na sequência incorrecta. 2. Placa revestida inactiva.	1. Verificar de novo o procedimento. Verificar se existe reagente por utilizar. Repetir a análise. 2. Verificar se existe humidade nos poços não utilizados. Limpar o fundo da placa e ler novamente.
Todos os resultados dos testes amarelos.	1. Tampões ou reagentes contaminados. 2. Solução de lavagem contaminada. 3. Diluição inadequada do soro.	1. Examinar todas as soluções à procura de turbidez ou um mau aroma. 2. Empregar um recipiente limpo. Verificar a qualidade da solução aquosa utilizada na preparação. 3. Repetir a análise.
OD máxima está elevada (excede 3,0)	1. Temperaturas de incubação muito elevadas/utilização de método automatizado	1. Diminuir o tempo de incubação do substrato
Pouca precisão.	1. CV de administração de pipeta mais de 5%. 2. Amostra ou reagentes não suficiente misturados ou não equilibrados à temperatura ambiente. 3. Adição do reagente demasiado demorada; inconsistência nos intervalos de cronometragem. 4. Via óptica não limpa.	1. Verificar a calibração da pipeta. Empregar a técnica reproduzível. 2. Misturar todos os reagentes cuidadosa mas completamente e equilibrar à temperatura ambiente. 3. Desenvolver uma técnica uniforme consistente e utilizar um dispositivo com várias pontas ou um auto-administrador para reduzir o período de tempo. 4. Verificar se os poços contêm bolhas de ar. Limpar o fundo da placa e ler novamente.

	5. Lavagem não consistente; bolhas presas; solução de lavagem permaneceu dentro dos poços.	5. Verificar se todos os poços estão cheios e se foram uniformemente aspirados. Administrar o líquido acima do nível de reagente no poço. Após a última lavagem, esvaziar os poços, batendo com a placa em papel absorvente.
	6. Pipetagem inadequada.	6. Evitar a formação de bolhas de ar nas pontas das pipetas.

REFERÊNCIAS

1. Bajetta, E., Ferrari, L., Martinetti, A., Celio, L., Procopio, G., Artale, S., Zilembo, N., Di Bartolomeo, M., Seregni, E. e Bombardieri, E.
Chromogranin A, neuron specific enolase, carcinoembryonic antigen, and hydroxyindole acetic acid evaluation in patient with neuroendocrine tumours.
*Cancer 1999, **86:**858-865.*

2. Eriksson, B., Öberg, K. e Stridsberg, M.
Tumour markers in neuroendocrine tumours.
*Digestion 2000, **62:**33-38.*

3. O'Connor, D.T. e Deftos, L.J.
Secretion of chromogranin A by peptide-producing endocrine neoplasms.
*New England Journal of Medicine 1986, **314:**1145-1151.*

4. Stridsberg, M., Hellman, U., Wilander, E., Lundqvist, G., Hellsing, K. e Öberg, K.
Fragments of chromogranin A are present in the urine of patients with carcinoid tumours: Development of a specific radioimmunoassay for chromogranin A and its fragments.
*Journal of Endocrinology 1993, **139:**329-337.*

5. Stridsberg, M., Öberg, K., Li, Q., Engström, U. e Lundqvist, G.
Measurements of chromogranin A, chromogranin B (secretogranin I), chromogranin C (secretogranin II) and pancreastatin in plasma and urine from patients with carcinoid tumours and endocrine pancreatic tumours.
*Journal of Endocrinology 1995, **144:**49-59.*

6. Stridsberg, M.
Measurements of chromogranins and chromogranin-related peptides by immunological methods.
*Advanced Experimental and Medical Biology 2000, **482:**319-327.*

7. Winkler, H. and Fischer-Colbrie, R.
The chromogranin A and B: The first 25 years and future perspectives.
*Neuroscience 1992, **49:**497-528.*

EXPLICAÇÃO DOS SIMBOLOS

Ag	Antigénio (placa revestida).
DIL	Diluente.
BUF **CONJ**	Tampão conjugado.
CONJ **100X**	HRP conjugado conc. 100 vezes.
BUF **WASH** **20X**	Tampão de lavagem concentrado 20x.
SUBS **TMB**	Solução TMB (solução substrato).
H_2SO_4 **0.5M**	Ácido sulfúrico, 0,5 molar (solução de paragem).
CAL **X** **LYO**	Calibrador liofilizado.
CONTROL **L** **LYO**	Controlo baixo liofilizado.
CONTROL **H** **LYO**	Controlo alto liofilizado.

	Número do lote.
	Número de catálogo.
	Utilizar até.
	Limite de temperatura.
	Risco biológico.
	Consultar as instruções de utilização.
	Dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro*.
	Fabricante.
	Atenção.
96	Contém o suficiente para 96 testes.
	Conformidade com In Vitro Diagnostic Directive 98/79/EC, Diretiva de Dispositivos Médicos.

EURO DIAGNOSTICA AB

Lundavägen 151, SE-212 24 Malmö, Sweden
Phone: +46 40 53 76 00, Fax: +46 40 43 22 88
E-mail: info@eurodiagnostica.com
www.eurodiagnostica.com